

I. Die Glykoside der Blätter von *Digitalis obscura*

L. ssp. obscura

II. ψ -Bufarenogin, ein neues Bufadienolid aus *Ch'an Su*
und Umlagerungsprodukt des Arenobufagins
sowie Bemerkungen zur Konfiguration des Bufarenogins

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

KURT HUBER

aus Nusshof (Baselland)

1965

Basel

Buchdruckerei Birkhäuser AG.

1967

I. Die Glykoside der Blätter von *Digitalis obscura*
L. ssp. obscura

II. ψ -Bufarenogin, ein neues Bufadienolid aus *Ch'an Su*
und Umlagerungsprodukt des Arenobufagins
sowie Bemerkungen zur Konfiguration des Bufarenogins

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

KURT HUBER

aus Nussdorf (Baselland)

Basel

Buchdruckerei Birkhäuser AG.

1967

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren Dr. K. MEYER und Dr. T. REICHSTEIN.

Basel, den 23. November 1965

Prof. Dr. H. ANNAHEIM
Dekan

Herrn KURT HUBER wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 23. November 1965 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 23. November 1965 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

«I. *Über die Inhaltstoffe der Blätter von Digitalis obscura L. ssp. obscura*
II. *ψ -Bufarenogin, ein neues Bufadienolid aus Ch'an Su*
und Umlagerungsprodukt des Arenobufagins und Abklärung
der Konfiguration des Bufarenogins»

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Pharmazeutischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.



Meinem verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. KUNO MEYER

möchte ich auch an dieser Stelle für das rege Interesse, welches er dieser Arbeit entgegenbrachte und für die vielen wertvollen Anregungen meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Ausserdem danke ich Herrn Dr. HORST H. A. LINDE für seine Ratschläge und die Hilfe bei der Diskussion der Arbeit.

Frl. SIGRID SPENGLER und Herrn EMIL HAUSER danke ich für die experimentelle Mithilfe.

Die Glykoside der Blätter von *Digitalis obscura* L. ssp. *obscura*¹⁾

Digitalis obscura L. ssp. *obscura* kommt im Osten von Spanien (vom südlichen Teil Kataloniens bis hinab zur Sierra Nevada) ziemlich verbreitet vor. In der Literatur [1] werden auch zwei Fundorte für diese *Digitalis*-Art in Marokko angegeben.

Frühere chemische Untersuchungen. Diese Pflanze wurde erstmals von NOVELLA & LONZANO [2] auf ihren Gehalt an Glykosiden hin untersucht. Diese Autoren berichteten über die Isolierung einer als «Obscuraglykosid» bezeichneten Substanz, die, wie weitere Untersuchungen [3] zeigten, keine positive LEGAL- und RAYMOND-Reaktion gab und auch im UV. keine für Cardenolide typische selektive Absorption zwischen 215 und 218 nm zeigte.

Beschaffung des Untersuchungsmaterials. Herr Dr. C. R. GAVILANES²⁾ hatte die Freundlichkeit, uns das Pflanzenmaterial auf der Sierra de Mainò (Alicante) sammeln zu lassen³⁾.

Extraktion und Vortrennung. Die Extraktion der staubfein gemahlten Blattdroge erfolgte mit 95-proz. Äthanol. Der (im Vakuum) konzentrierte Auszug wurde mit einer wässrigen $\text{Pb}(\text{OH})_2$ -Suspension gereinigt, filtriert und im Vakuum vom Äthanol befreit. Die so gewonnene wässrige Glykosidlösung extrahierte man der Reihe nach erschöpfend mit den in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmitteln.

¹⁾ Zur Taxonomie siehe WERNER [1].

²⁾ Wir danken Herrn Dr. GAVILANES (Las Palmas, Gran Canaria) bestens für seine Hilfe bei der Beschaffung des Drogenmaterials.

³⁾ Als Sammeldaten wurden uns angegeben: 13. 5. 1963, 26. 6. 1963 und 19. 12. 1963. Die Trocknung der Blätter erfolgte bei 45°.

Der folgenden Tabelle 1 lässt sich entnehmen, dass der grösste Teil der herzaktiven Substanzen im Chf-Alk-(4:1)-Extrakt enthalten ist. Ein Vergleich der Toxizität von *D. obscura* mit derjenigen des Internationalen *D. purpurea*-Standards zeigt, dass *D. obscura* etwa 2mal toxischer ist.

Eine orientierende Untersuchung der einzelnen Extrakte mit Hilfe der Pchr⁵⁾ gab das folgende Bild:

Ae-Extrakt. Im System KAISER I [5] (absteigend, Laufstrecke der Front 40 cm) konnten mit SbCl₃ 6 Substanzen nachgewiesen werden, wovon 2 im UV.-Licht eine hellblaue Fluoreszenz zeigten. Mit KEDDE-Reagens [4] färbten sich nur 4 Substanzen, deren unpolarste einen dem Acetyldigitoxin (4) entsprechenden Rf-Wert aufwies.

Tabelle 1. Ausbeuten an Rohextrakten aus 1,2 kg Blattpulver von *D. obscura*⁴⁾

Extrakt ⁵⁾	Menge in g	in %	Toxizität mg/kg ⁶⁾	Anzahl K. D. ⁷⁾
Ae	6,46	0,54		
[Soda-Auszug der Ae-Extrakte]	[2,87]	[0,24]		
Chf	7,12	0,59	3,5 ± 0,8	1700
Chf-Alk-(4:1)	42,3	3,52	2,7 ± 0,5	13000
Chf-Alk-(3:2)	— ⁸⁾			
<i>D. obscura</i> (Blattpulver)			56 ± 1	18000
<i>D. purpurea</i> (Standard)			106 ± 8	9500

Chf-Extrakt. Im System KAISER II [5] (absteigend, 5 Std.), konnten mit SbCl₃ etwa 8 Substanzen deutlich gemacht werden, wovon 6 im UV.-Licht eine hellblaue Fluoreszenz zeigten. Mit KEDDE-Reagens [4] besprüht, bildeten sie 3 langgezogene Flecke, deren Rf-Werte denjenigen der Lanatoside A (3), B (7) und E (11) entsprachen.

Chf-Alk-(4:1)-Extrakt. Im System KAISER II [5] (absteigend, 3¹/₂–4 bzw. 21 Std.) liessen sich mit SbCl₃ 8–9 Substanzen sichtbar machen. Davon färbten sich 5 auch mit KEDDE-Reagens [4]. Die Rf-Werte (Reihenfolge entsprechend zunehmender Polarität) dieser Substanzen entsprachen denjenigen von Lanatosid A (3), Lanatosid E (11), Purpureaglykosid A (1) und Lanatosid B (7)⁹⁾, Glucogitaloxin (9), Purpureaglykosid B (5) und Glucogitorosid (8).

1. Untersuchung des Äther-Extraktes. – Der mit verd. Sodalösung gründlich ausgeschüttelte Ae-Extrakt (Aufarbeitung der vereinigten Sodauszüge siehe weiter

⁴⁾ Diese in Tab. 1 aufgeführten Angaben beziehen sich auf das am 1. 6. 1964 gesammelte Blattmaterial.

⁵⁾ Abkürzungen für Lösungsmittel usw. vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

⁶⁾ Die Toxizitätsbestimmung (Methode nach HATCHER-MAGNUS an der Katze) wurde von den Herren Drs. A. HÜRLIMANN und H. P. BÄCHTOLD in den Pharmakologischen Laboratorien der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, ausgeführt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

⁷⁾ K. D. = Katzendosis. Die in dieser Kolonne angegebenen Werte sind auf 1,0 kg (!) Droge umgerechnet.

⁸⁾ Dieser Extrakt war KEDDE [4]-negativ und wurde deshalb verworfen.

⁹⁾ Lanatosid B (7) hat praktisch den gleichen Rf-Wert wie 1. Im Lanatosid B lässt sich die O-Acetylgruppe durch verd. NH₃-Lösung leicht verseifen, wobei Purpureaglykosid B (5) entsteht, das sich in der Polarität dann stark vom Purpureaglykosid A (1) unterscheidet.

unten) wurde zunächst durch Chromatographie an SiO_2 einer groben Aufteilung unterzogen. Das erste Drittel der eluierten Substanz (z. T. als farblose, rotbraun, rot oder grün gefärbte ölige bzw. amorphe Fraktionsrückstände erhalten) war KEDDE-negativ. Nach erneuter chromatographischer Auftrennung des aus den ersten Eluatien gewonnenen rotbraun bzw. rot gefärbten Materials konnte ein (im DC einheitliches) in gelbroten, feinen Nadeln kristallisierendes Pigment vom Smp. $213\text{--}217^\circ$ (*Pigment I*) gewonnen werden.

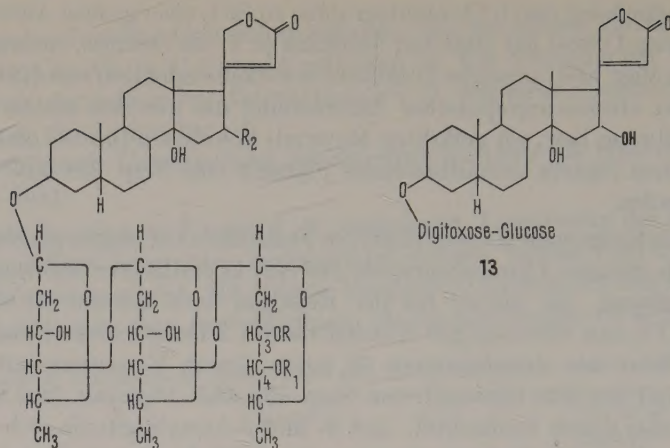
Aus den nachfolgenden KEDDE-positiven Fraktionen der obigen groben Aufteilung liess sich nach erneuter Chromatographie nur eine kristallisierte Substanz vom Smp. $152\text{--}162^\circ$ gewinnen, die sowohl bei der Reaktion nach KEDDE [4] als auch mit Xanthidrol [17] eine Färbung gab (Cardenolid mit 2-Desoxyzucker) und im DC den gleichen Rf-Wert wie *Acetyldigitoxin* (4) hatte. Durch Verseifung mit verd. NH_3 [18]¹⁰⁾ entstand aus dem Glykosid vom Smp. $152\text{--}162^\circ$ Digitoxin (nur im DC nachgewiesen). Dabei wurde beobachtet, dass α - und β -Acetyldigitoxin sich im Rf-Wert (DC) zwar wenig, in der Färbung dagegen sehr deutlich unterscheiden (siehe Exper. Teil).

Bei der oben erwähnten groben chromatographischen Aufteilung konnte nach der Eluierung des Acetyldigitoxins eine geringe Menge eines KEDDE-negativen Produktes von der Säule gelöst werden, welches nach erneuter Chromatographie Kristalle vom Smp. $241\text{--}246^\circ$ gab (*Substanz a*). Weitere Angaben siehe weiter unten (Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes).

Die mit roter Farbe in verd. Sodalösung löslichen Anteile des Ae-Extraktes (siehe oben) wurden nach dem Ansäuern in Ae zurückgeschüttelt. Das dabei erhaltene dunkelbraune Produkt war grösstenteils in An löslich. Der unlösliche Anteil (etwa 10%) erwies sich im DC als einheitlich (das in An lösliche Material gab 7 Flecke und wurde nicht näher untersucht) und dürfte ein bisher in der Gattung *Digitalis* noch nicht beobachtetes Flavon (*Pigment II*) vom Zers.-Punkt bei etwa 320° sein. Über die Pigmente I und II soll später in anderem Zusammenhang berichtet werden.

2. Untersuchung des Chloroform-Extraktes. – Nach chromatographischer Aufteilung liess sich nur ein kleiner Teil der Fraktionen [mit Chf-Me-(4:1)] kristallisieren. Die Kristallisate waren nach DC nicht einheitlich und konnten auch nach erneuter Chromatographie an SiO_2 nicht in die einzelnen Komponenten zerlegt werden. Die Kristallfraktionen enthielten nach Pchr die Lanatoside A (3), B (7) und E (11). Nach längerem Einwirken von verd. NH_3 -Lösung bestand das Produkt nach DC aus

¹⁰⁾ Zur Verseifung von O-Acetylgruppen, vor allem im Zuckeranteil acetylierter Glykoside, ist vielfach die von REICHSTEIN und Mitarb. [19] angegebene Methode (KHCO_3 in wässrigem Methanol) verwendet worden. Sehr verdünntes NH_3 wurde von den rumänischen Autoren [18] zur Verseifung der Formylgruppe in Gitaloxigenin-Glykosiden empfohlen, wobei offenbar O-Acetylgruppen (im Zuckeranteil) nicht angegriffen wurden. Wir fanden (siehe Exper. Teil), dass mit verd. NH_3 -Lösung auch die in der 3. Digitoxose-Molekel der Lanatoside befindliche O-Acetylgruppe leicht und auf einfachere Weise als mit KHCO_3 verseift wird. Lässt man auf ein Gemisch, das nach DC etwa aus gleichen Teilen des α - und β -Isomeren besteht, verd. NH_3 einwirken, so erscheint nach einer gewissen Zeit im DC neben dem Fleck des Digitoxins (2) nur noch der des β -Acetyldigitoxins. Dass das α -Isomere (mit *axialer* Acetoxygruppe) leichter verseift wird, erscheint wenig wahrscheinlich. Unter dem Einfluss des verd. NH_3 könnte aber die Acylwanderung [von C-3 (axial) = α nach C-4 (äquatorial) = β siehe Formel 4] viel rascher verlaufen als die Verseifung der Acetoxygruppe.



1	R = H	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = H	: Purpureaglykosid A [6]
2	R = H	R ₁ = H	R ₂ = H	: Digitoxin [7] [8]
3	R = Ac	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = H	: Lanatosid A [7]
4	R = Ac	R ₁ = H	R ₂ = H	: Acetyldigitoxin [9]
5	R = H	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OH	: Purpureaglykosid [6]
6	R = H	R ₁ = H	R ₂ = OH	: Gitoxin [10]
7	R = Ac	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OH	: Lanatosid B [7]
8	R = Ac	R ₁ = H	R ₂ = OH	: Acetylgitoxin [11]
9	R = H	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OCHO	: Glucogitaloxin [12]
10	R = H	R ₁ = H	R ₂ = OCHO	: Gitaloxin [12]
11	R = Ac	R ₁ = Glucosyl	R ₂ = OCHO	: Lanatosid E [14]
12	R = Ac	R ₁ = H	R ₂ = OCHO	: Acetylitaloxin [15]
13	Glucogitorosid [16]			

den Lanatosiden A (3) und B (7) sowie aus den Purpureaglykosiden A (1) und B (5) [Verseifung sowohl der Formyl- (an C-16) als auch z. T. der O-Acetylgruppe in der Zuckerkette]. – Aus diesem Glykosid-Gemisch liess sich dann das *Lanatosid A* (3) als einheitliches Kristallinat gewinnen.

3. Untersuchung des Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extraktes. – *Versuche zur Auftrennung der Primärglykoside.* Weder durch Verteilungschromatographie an Hyflo Supercel/Wasser als ruhender Phase und wassergesättigtem Methyläthylketon oder Chloroform-Butanol-Gemischen als beweglicher Phase [20], noch mit wasserhaltigem SiO₂ und wassergesättigtem Essigester [21] gelang es, einheitliche Kristallisate zu gewinnen. Diese gaben alle im DC 2–3 Flecke, die ungefähr den R_f-Werten der Purpureaglykoside A (1) und B (5) entsprachen.

Isolierung der Substanz A. Nur aus der Verteilungschromatographie mit Chloroform-Butanol-Gemischen liess sich ein einheitliches, allerdings KEDDE-negatives Kristallinat vom Smp. 207–214° gewinnen, das wir vorläufig als Substanz A bezeichnen. Diese gab eine positive Xanthidrol-Reaktion (auf 2-Desoxyglykoside) und liess sich auf fermentativem Wege in ein Desgluco-Produkt überführen, das sich im DC identisch mit der aus dem Ae-Extrakt isolierten Substanz a erwies. Die IR.-Spektren der beiden Substanzen A und a zeigen keine signifikanten Unterschiede. Der Mehr-

gehalt an Glucose in Substanz A hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Struktur des IR.-Spektrums.

Da eine Auftrennung der Primärglykoside, wie eben erwähnt, erfolglos blieb, versuchten wir eine Aufteilung der Glykoside auf der Desgluco-Stufe zu erzielen. Die Abspaltung der endständigen Glucose liess sich relativ leicht mit Fermentgemischen aus Schimmelpilzen¹¹⁾ durchführen. Den Fermentierungsansätzen wurden durch Ausschütteln mit Chf die Desgluco-Produkte entzogen, die je nach Drogenmuster zwischen 24 und 51% des zur Fermentierung eingesetzten Chf-Alk-(4:1)-Extraktes ausmachten. Die hierauf durch Ausschütteln der Fermentierungslösung mit Chf-Alk-(4:1) zurückgewonnenen nichtfermentierten Anteile betrugen zwischen 34 und 54%. Sie wurden nachfermentiert und gaben wiederum in Chf lösliche Anteile, die im DC praktisch dasselbe Fleckenmuster zeigten, wie die aus den ersten Fermentierungsansätzen erhaltenen Gemische der Desgluco-Produkte. Bei gewissen Drogenchargen machten wir die Beobachtung, dass unter Berücksichtigung der bei der Fermentierung abgespaltenen Glucose (Purpureaglykosid A $\rightarrow$ Digitoxin + Glucose) die Summe der durch Chf und Chf-Alk-(4:1) ausschüttelbaren Anteile kleiner war als die Menge des jeweils zur Fermentierung eingesetzten Materials [Chf-Alk-(4:1)-Extrakt]. Diese «Verluste» machten 3,6% (Fehlergrenze) bis 37% aus und entsprachen jeweils den durch Eindampfen der wässrigen Phasen erhaltenen Trockenrückständen. Es handelte sich demnach bei diesen «Verlusten» – wenn man von der Glucose absieht – um Material, das nach (oder infolge) der Fermentierung nicht mehr ausschüttelbar ist. Tab. 2 illustriert an einem Beispiel diese Beobachtung.

Tabelle 2. *Desgluco-Produkte und «Verluste» nach Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes*

Chf-Alk-(4:1)-Extrakt in g	Chf-Auszug		Chf-Alk-(4:1)- Auszug		Im Wasser verblieben		Glucose ¹²⁾	Verlust
	in g	in %	in g	in %	in g	in %	in %	in %
1. Fermentierung 13,2	5,70	43,3	4,84	36,8	2,70	20,5	10,2	10,3
1. Nachfermentierung 4,84	1,27	26,2	2,3	47,6	1,24	25,7	6,2	19,5
2. Nachfermentierung 2,3	0,40	17,5	1,24	54,0	0,66	28,7	4,1	24,6

Eine verdorbene Drogencharge¹³⁾ gab auffallenderweise einen Chf-Alk-(4:1)-Extrakt, der nach Fermentierung und Aufarbeitung die geringsten «Verluste» (3,6%) zeigte.

Aus Tab. 2 ist u. a. auch ersichtlich, dass bei der Nachfermentierung jeweils weniger Desgluco-Produkte gebildet werden, und dass prozentual auch die Anteile an «Verlusten» zunehmen.

¹¹⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle der Firma RÖHM & HAAS, GMBH., Darmstadt, für das uns überlassene Muster dieses Enzympräparates bestens danken. Nach Angaben der genannten Firma enthält das als Präparat E. L. 33–63 bezeichnete Fermentgemisch Pektinasen, Cellulasen und andere β -Glucosidasen aus Schimmelpilzkulturen (Wirkungsoptimum bei pH 4–5,5).

¹²⁾ Die Menge der abgespaltenen Glucose wurde auf der Basis Purpureaglykosid A (MG. 927) $\rightarrow$ Digitoxin (MG. 765) + Glucose (MG. 180) berechnet.

¹³⁾ Diese war in angesammeltem und feuchtem Zustand eingetroffen. Nach Auslesen der am meisten verdorbenen Anteile wurde der Rest bei 45° getrocknet, wobei eine stark braun gefärbte Droge resultierte.

Die im Wasser verbliebenen, nicht mehr ausschüttelbaren Anteile (= «Verluste») waren KEDDE-negativ. Die Prüfung auf 2-Desoxyzucker (Digitoxose) mit Xanthhydrol-Reagens gab kein eindeutiges Resultat, da das geprüfte Material stark gefärbt war. Im Pchr und im DC liess sich Glucose leicht nachweisen. Sie konnte ausserdem in Form des kristallisierten Phenyllosazons isoliert und charakterisiert werden. Digitoxose war weder im Pchr noch im DC nachweisbar. Die beobachteten «Verluste» können somit nicht allein durch die Abspaltung der Glucose erklärt werden, sondern müssen eine andere Ursache haben. Dass unter dem Einfluss des Enzympräparates grössere Zuckerreste, wie z.B. Digilanidobiose, abgetrennt werden, ist unwahrscheinlich, da dieses Disaccharid durch das verwendete Fermentpräparat sehr rasch in Glucose und Digitoxose gespalten wird. Da zudem der Hauptteil der mit Chf-Alk-(4:1) ausschüttelbaren Glykoside nach DC ein Gemisch der Purpureaglykoside A und B und der Lanatoside A, B und E darstellt (siehe weiter unten), können die «Verluste» auch nicht dadurch erklärt werden, dass Glykoside mit mehreren Glucoseresten ursprünglich vorgelegen hatten.

Um hier einen gewissen Einblick zu gewinnen, wurde versucht, die Glucose quantitativ zu bestimmen. Dazu wurden die eingengten Wasserphasen (der ausgeschüttelten Fermentierungsansätze) verwendet. Sie stellten einen stark gelbbraun gefärbten Sirup dar. Mit den für den Glucosenachweis spezifischen Testpapieren («LILLY Test-Tape»), wie sie zur Glucosebestimmung im Harn verwendet werden, konnte ein Glucosegehalt von *nur* rund 10% (bezogen auf den Trockenrückstand) ermittelt werden. Mit der Methode nach FEHLING (Ausfällung von Cu_2O) enthielt der Trockenrückstand demgegenüber 60% an reduzierenden Stoffen (als Glucose berechnet). Obwohl mit dieser Methode auch andere reduzierende Stoffe erfasst werden, ergibt sich trotzdem noch ein «Verlust» von 40%¹⁴⁾.

Aufarbeitung der durch Fermentierung gewonnenen Desgluco-Produkte. –

1. *Isolierung von Digitoxin (2)*. Nach Chromatographie an SiO_2 liess sich aus einer Reihe von Fraktionen [mit Chf-Me-(4:1)] nicht ganz reines Digitoxin (2) gewinnen, das aber nach erneuter Auftrennung an SiO_2 völlig rein erhalten werden konnte.

2. *Isolierung von Gitaloxin (10)*. Bei der eben unter 1. erwähnten SiO_2 -Chromatographie waren Digitoxinkristallisate erhalten worden, die im DC mit SbCl_3 nur einen schwach blau fluoreszierenden Fleck gaben, dessen R_f -Wert identisch mit dem des Digitoxins war. Im Pchr (System KAISER I [5]) hingegen liess sich neben einem im UV. nicht fluoreszierenden Fleck (Digitoxin) ein schwächerer, durch eine polarere und hellblau leuchtende Substanz hervorgerufen, feststellen. Durch präparative Pchr konnte das polare Produkt in papierchromatographisch einheitlichen Kristallen vom Smp. 256–260° gewonnen werden. Es erwies sich beim direkten Vergleich¹⁵⁾ als Gitaloxin (10). Nach dem Verseifen mit verd. NH_3 [18] entstand daraus Gitoxin (6).

3. *Isolierung von Gitoxin (6) und Anreicherung des Glykosids GX*. Im Anschluss an das Gemisch Digitoxin-Gitaloxin wurde ein weiteres Gemisch zweier KEDDE-positiver

¹⁴⁾ Nach Abschluss dieser Untersuchungen wurde mit einem Belegmuster eines nichtfermentierten Chf-Alk-(4:1)-Extraktes die FEHLING'sche Probe ausgeführt, die stark positiv ausfiel. Für eine quantitative Bestimmung der reduzierenden Bestandteile reichte die zur Verfügung stehende Menge des Musters leider nicht mehr aus.

¹⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. F. KAISER, C. F. BOEHRINGER & SÖHNE, GMBH, Mannheim, bestens für die Überlassung dieser und einer Reihe weiterer Proben von Digitalisglykosiden.

[5] Substanzen eluiert. Die im DC nach dem Besprühen mit SbCl_3 -Lösung erhaltenen Flecke dieser beiden Substanzen zeigten im UV. die für Gitoxigeninglykoside charakteristische hellblaue Fluoreszenz. Durch präparative DC liess sich das unpolare Produkt rein erhalten und als Gitoxin (6) identifizieren. Die polarere Substanz mit Gitoxigenincharakter – vorläufig als GX bezeichnet – konnte nicht frei von 6 erhalten werden. Eine Identifizierung auf Grund des Rf-Wertes im DC war nicht möglich. Von den bekannten Gitoxigeninglykosiden, die im DC polarer als Gitoxin sind und ähnliche Rf-Werte wie die Substanz GX haben, kommen nur Strosposid [22] und Verodoxin [23] in Frage. Beim direkten Vergleich mit diesen Glykosiden zeigte sich aber, dass die Substanz GX deutlich polarer ist. Gitoxigeninglykoside, die eine Einheit Glucose mehr besitzen, wie z. B. Digitalinum verum [10] [24] [22], Glucoverodoxin [25] usw. kommen *a priori* in Wegfall, da bei der Fermentierung die endständige Glucose abgespalten worden wäre. Abgesehen davon sind diese Glucoprodukte im DC wesentlich polarer als GX.

4. *Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitoxin (12)*. Diese beiden Glykoside wurden bei der Chromatographie der durch Fermentierung gewonnenen Desgluco-Produkte als erste KEDDE-positive [5] Substanzen von der SiO_2 -Säule eluiert und waren sehr schwer von dem sie begleitenden Digitoxin abzutrennen. Bei einem durch Nachfermentierung gewonnenen Gemisch von chloroformlöslichen Desgluco-Produkten (siehe Tab. 2) konnte nach erneuter Chromatographie an SiO_2 ein Kristallisat gewonnen werden, das nach DC (in zwei verschiedenen Systemen) einheitlich zu sein schien, nach Pchr (System KAISER I [6]) dagegen 2 Substanzen enthielt, deren Rf-Werte denjenigen von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitoxin (12) entsprachen. Wegen Substanzknappheit wurde auf eine Auftrennung dieser beiden Glykoside im präparativen Pchr verzichtet. Nach Verseifen einer kleinen Probe mit verd. NH_3 -Lösung konnte sowohl im DC als auch im Pchr Digitoxin (2), Acetylgitoxin (8) und Gitoxin (6) nachgewiesen werden. Der Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitoxin (12) in den durch Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes gewonnenen Produkten ist indirekt auch ein Beweis dafür, dass in der Pflanze die Lanatoside A (3) und E (11) enthalten sind. Diese Lanatoside konnten auch im Chf-Extrakt nachgewiesen werden (siehe oben).

5. *Isolierung von Substanz a*. Aus den mit Chf extrahierbaren Anteilen der 2. Nachfermentierung (siehe Tab. 2) eines Chf-Alk-(4:1)-Extraktes konnte nach der Chromatographie an SiO_2 ein einheitliches Kristallisat vom Smp. 241–246° und $[\alpha]_D = -23^\circ$ erhalten werden, welches im Pchr und im DC sehr polar war (wesentlich polarer als Gitoxin)¹⁶: Substanz a. Die gleiche Substanz war auch im Ae-Extrakt (siehe Exper. Teil) aufgefunden worden. Sie stellt ein 2-Desoxyglykosid (positive Xanthydroprobe) dar. Der nach milder Hydrolyse gewonnene Zuckerteil enthielt nach DC und Pchr neben Digitoxose noch einen weiteren, polareren 2-Desoxyzucker (positive Xanthydroprobe), der bisher aber noch nicht identifiziert werden konnte. Der Aglykonanteil bestand nach DC aus mindestens 4 Substanzen. Er wurde nicht weiter untersucht. – Die Substanz a zeigt im UV. nur Endabsorption. Damit kann es sich bei diesem Glykosid nicht um ein Cardenolid handeln. Auch die KEDDE-Reak-

¹⁶) Substanz a kommt in der Pflanze – wie oben bereits erwähnt – in genuiner Form als Glucosido-Verbindung (= Substanz A) vor.

tion [5] fiel negativ aus. Da die Digitanolglykoside – wenigstens die bisher aufgefundenen – im Bereich von 300 nm selektive Absorption zeigen, dürfte die Substanz a auch nicht dieser Stoffklasse angehören. Dass es sich schliesslich um ein Saponin handeln könnte, ist auf Grund des IR.-Spektrums wenig wahrscheinlich, da diesem die für Saponine typischen Banden fehlen. Das Molekulargewicht wurde mit rund 700 ermittelt. Die Elementaranalyse passte auf die Bruttoformel $C_{36}H_{60}O_{12}$.

Der eine von uns (K. H.) dankt dem STIPENDIENFONDS ZUR UNTERSTÜTZUNG VON DOKTORANDEN AUF DEM GEBIETE DER CHEMIE für das ihm gewährte Stipendium. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS danken wir für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit und Frl. SIGRID SPENGLER für ihre gewissenhafte und sorgfältige experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze bis 200° , $\pm 2^\circ$, darüber $\pm 3^\circ$. Zur Säulenchromatographie wurde meist Kieselgel (SiO_2 «MERCK», 0,05–0,2 mm) verwendet.

Abkürzungen: Ac_2O = Acetanhydrid, AcOH = Eisessig, Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Di = Dioxan, DC = Dünnschichtchromatographie oder Dünnschichtchromatogramm, Fmd = Formamid, KEDDE-(+) bzw. -(–) = KEDDE-positiv bzw. -negativ, Fr = Fraktion(en), Me = Methanol, Mek = Methyl-äthylketon, ML = eingedampfte Mutterlauge(n), Pchr = Papierchromatographie bzw. Papierchromatogramm, Pe = Petroläther, Pn = *n*-Pentan, RV = Rotationsverdampfer, $SbCl_3$ = 20-proz. $SbCl_3$ in Chf, Py = Pyridin, To = Toluol, Tr. = Tropfen, UV. für DC und Pchr = UV.-Licht von ca. 350 nm, W = Wasser.

Extraktion der Blätter. – Beispiel: 1,2 kg lufttrockene, staubfein gemahlene Blätter wurden mit 2 l Alk aufgeschlämmt und 1 Std. unter gelegentlichem Rühren im Wasserbad bei 60° stehen gelassen. Hierauf wurde noch warm durch eine mit Hyflo Supercel gedichtete Nutsche filtriert, die Blattpulverschicht sorgfältig abgehoben und diese mit 1,5 l frischem Alk wie bei der ersten Extraktion ausgezogen und durch dieselbe Nutsche filtriert. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis das extrahierte Blattpulver nur noch sehr wenig bitter schmeckte (was nach 7–9 Extraktionen der Fall war). Die einzelnen Filtrate wurden gesondert im Vakuum bei 50° eingeeengt (der erste Extrakt auf etwa 200 ml, die späteren jeweils auf etwa 50 ml) und vereinigt. Der total etwa 600–700 ml betragende, dunkelgrün gefärbte, etwas viskose Extrakt wurde mit 600–700 ml einer Aufschlammung von frisch (aus 1,3 kg Bleiacetat-trihydrat) gefälltem und mit kaltem Wasser neutral gewaschenem $Pb(OH)_2$ versetzt und 30 Min. geschüttelt. Hierauf wurde durch eine mit Hyflo Supercel gedichtete Nutsche filtriert, der $Pb(OH)_2$ -Niederschlag mit 300 ml 50-proz. Alk nachgewaschen, der Filtrückstand abgehoben, in 500 ml 50-proz. Alkohol aufgeschlämmt, 15 Min. geschüttelt, abgenutscht und noch 2mal mit 80-proz. Alk in gleicher Weise ausgezogen. Die vereinigten Filtrate (etwa 3,5 l) wurden mit verd. H_2SO_4 auf ein pH von 5,8 gebracht und im RV bei 40° und etwa 12 Torr vom Alk befreit (Endvolumen 700–800 ml). Die wässrige Glykosidlösung wurde nun im Scheidetrichter 8mal mit je 1,5 l Ae, 6mal mit je 1 l Chf, 7–9mal mit je 1 l Chf-Alk-(4:1) (bis KEDDE-(–)) ausgeschüttelt. [Die mit Chf-Alk-(3:2) extrahierte Substanz war KEDDE-(–).] Alle Auszüge passierten der Reihe nach noch 3 Scheidetrichter, die je 150 ml W enthielten, und wurden dann über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Die Ae-Auszüge wurden als einzige noch zusätzlich 5mal mit je 150 ml verd. Sodalösung gewaschen. Die rot gefärbten, wässrigen Soda-Auszüge wurden nach dem Ansäuern mit verd. H_2SO_4 mit Ae erschöpfend extrahiert und die Ae-Phasen nach Waschen mit W und Trocknen über Na_2SO_4 und Filtrieren im Vakuum eingedampft. Der dabei erhaltene Rückstand enthielt das Pigment II (siehe weiter unten). Über die aus den verschiedenen Ausschüttelungen erhaltenen Ausbeuten orientiert ein in Tab. 1 im Theoret. Teil wiedergegebenes Beispiel.

Untersuchung des Ae-Extraktes. – *Vortrennung durch Chromatographie an SiO_2 .* Ein mit verd. Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelter Ae-Extrakt (Trockengewicht 12,3 g) wurde über eine mit Pe-Bz-(1:1) bereitete SiO_2 -Säule (300 g) chromatographiert (Fr zu 100 ml). In 67 Fr konnten total 11,3 g (91%) der eingesetzten Substanzmenge wieder von der Säule eluiert werden. – Die mit

Pe-Bz-(1:3) gewonnenen Eluate gaben 85 mg öligen, farblosen Eindampfrückstand, der KEDDE-(–) war und nicht weiter untersucht wurde. Das hierauf mit Pe-Bz-(1:6), Bz, Chf und Chf-Me-(9:1) eluierte, ebenfalls KEDDE-(–) Material war rotbraun bzw. grün gefärbt, wog 680 mg und enthielt Pigment I (siehe weiter unten). Beim weiteren Durchwaschen der Säule mit Chf-Me-(9:1) konnte im ganzen 9,8 g KEDDE-(+) Material erhalten werden. Mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch liessen sich hierauf noch 640 mg Substanz eluieren, die KEDDE-(–) war: enthielt die Substanz a (siehe weiter unten). Die folgenden mit Chf-Me-(4:1) und Me gewonnenen Fr enthielten ebenfalls nur KEDDE-(–) Material, das nicht näher untersucht wurde. Die KEDDE-(+) Fr-Rückstände zeigten im DC jeweils mehrere Flecke.

Isolierung von Pigment I. Die oben erwähnten, das Pigment I enthaltenden Fr-Rückstände (680 mg) der Gross-Chromatographie wurden nochmals an SiO_2 aufgeteilt. Aus den Fr mit Bz-Pe-(7:3) konnte eine kleine Menge einer in gelbroten Nadeln kristallisierenden Substanz vom Smp. 213–217° isoliert werden. Weitere kleine Mengen dieses Farbstoffes liessen sich nur auf folgende Weise gewinnen: die ML wurden auf einer kleinen SiO_2 -Säule so lange mit Chf-Bz-(3:7) entwickelt, bis der gelbrote Farbstoff als isolierte Zone gut abgegrenzt war. Nun wurde das Durchwaschen unterbrochen, das SiO_2 vorsichtig ausgestossen, die Farbstoffzone abgetrennt und diese mit Chf-Me-(3:1) eluiert. Es konnten so im ganzen nur 17 mg des Pigmentes I gewonnen werden. Die Acetylverbindung bildet hellgelbe Nadelchen vom Smp. 130–132°.

Isolierung von Acetyldigitoxin (4). Der erste KEDDE-(+) reagierende Eindampfrückstand (2,6 g) der Chf-Me-(9:1)-Eluate der obigen Gross-Chromatographie wurde nochmals in 44 Fr an SiO_2 aufgeteilt. Aus der 37. Fr [mit Chf-Me-(99:1)] konnten Kristalle gewonnen werden, die nach dem Umlösen aus Me-Ae 42 mg Nadelchen vom Smp. 152–162° gaben. Im DC [System Chf-Me-(9:1)] nur ein Fleck, der den gleichen Rf-Wert wie Acetyldigitoxin aufwies. Nach Verseifen mit verd. NH_3 liess sich im DC ein polarerer Fleck mit dem Rf-Wert des Digitoxins nachweisen. Das isolierte Acetyldigitoxin stellte ein Gemisch von α - und β -Acetyldigitoxin dar. Unterscheidung der beiden Digitoxine im DC: wird die Platte [Rillenglas] [26] langsam erhitzt, so ist der auftretende Fleck in seinem oberen Teil violett (β -Acetyldigitoxin), im gleich daran anschliessenden unteren Teil (α -Acetyldigitoxin) braun gefärbt. Beim weiteren Erhitzen gehen die beiden Farben in ein einheitliches Graublau über¹⁷⁾. Wir haben das aus *D. obscura* isolierte Acetyldigitoxin-Gemisch nach STOLL & KREIS [9] in das α - und β -Isomere getrennt: das β -Acetyldigitoxin (feine Nadeln) schmolz bei 230–245° [die Mischprobe mit authentischer Substanz¹⁷⁾ bei 225–242°, die Mischprobe mit dem α -Produkt bei 150–170°; das α -Acetyldigitoxin (rechteckige, klare Quadern) schmolz bei 208–220°]. – Wird 0,5 mg des Mischkristallisates, in 2 Tr. Chf und 2 Tr. Me gelöst, mit 1 Tr. 1*N* NH_3 -Lösung versetzt und in kurzen Zeitabständen im DC kontrolliert, so lässt sich in diesem schliesslich neben Digitoxin nur noch β -Acetyldigitoxin nachweisen.

Isolierung der Substanz a. Das mit Chf-Me-(9:1) bei der obigen Gross-Chromatographie eluierte KEDDE-(–) Material (640 mg) wurde nochmals an einer SiO_2 -Säule aufgetrennt. Die aus den Fr mit Chf-Me-(19:1) und -(9:1) gewonnenen Eindampfrückstände gaben aus An-Me 122 mg feine Nadelchen vom Smp. 207–210° (rohe Substanz a). Durch präparative Pchr wurde analog wie bei der Isolierung des Gitaloxins (siehe weiter unten) reine Substanz a vom Smp. 241–246° erhalten. Weitere Einzelheiten über dieses Produkt siehe weiter unten (Fermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes).

Isolierung von Pigment II. Die aus den Sodauszügen der Ae-Extrakte gewonnene braungelbe Substanz wurde mit An versetzt, das einen grossen Teil der färbenden Bestandteile aufnahm und ein gelbgrünes Pulver ungelöst zurückliess. Dieses konnte in viel Chf-Me in Lösung gebracht werden und schied sich beim Wegdampfen des Lösungsmittels wieder als gelbliches, leicht grünstichiges kristallines Pulver aus. Smp. ca. 320° (Zers.). Die Acetylverbindung – in $\text{Py-Ac}_2\text{O}$ bereitet – gab nach 2maligem Umlösen aus Essigester hellgelbe, feine Nadelchen, Smp. 214–218°.

Untersuchung des Chf-Extraktes. – 15,9 g Chf-Extrakt (aus 2,35 kg Blattpulver) wurden an 300 g SiO_2 in 69 Fr aufgeteilt (Fr zu 100 ml). Zum Entwickeln der Chromatographie diente zunächst Chf-Bz-(1:1), Chf-Bz-(3:1), Chf und Chf-Me-(99:1) bzw. -(49:1). Erst von der 24. Fr mit Chf-Me-(24:1) an wurden nach dem Verdampfen des Lösungsmittels Rückstände erhalten. Aus

¹⁷⁾ Herrn Dr. A. VON WARTBURG, SANDOZ AG., Basel, danken wir für die Überlassung von α - und β -Acetyldigitoxin-Proben.

24 Fr [bis Chf-Me-(4:1)] liessen sich im ganzen etwa 8 g Substanz gewinnen, die z. T. ein grün, z. T. ein braun gefärbtes Öl darstellten. Die ersteren waren eindeutig KEDDE(-), die späteren KEDDE(?). Aus diesen Fr konnten keine Kristalle gewonnen werden. Sie wurden nicht mehr weiter untersucht. Die Fr 48-54 [mit Chf-Me-(4:1)] gaben nach dem Verdampfen 3,7 g Substanz, die eindeutig KEDDE(+) war. Aus den Fr 50-53 konnten total 1,26 g Kristalle gewonnen werden, die nach dem DC mehrere Substanzen enthielten. Eine erneute Aufteilung an SiO_2 gab 0,59 g eines Kristallisates, das im DC [System Chf-Me-(9:1)] nur noch 2 Flecke, im Pchr (System KAISER I) dagegen 3 Flecke gab, deren Rf-Werte denjenigen der Lanatoside A, B und E entsprachen. Dass diese Glykoside in diesem Mischkristallinat wirklich vorlagen, liess sich wie folgt beweisen: 0,48 g des Mischkristallisates wurden in 8 ml Me und einigen Tr. Chf gelöst, mit 2,5 ml einer wässrigen 1N NH_3 -Lösung versetzt und $1\frac{1}{2}$ Tage bei 20° stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde hierauf mit W verdünnt, das Me im Vakuum entfernt, die wässrige Lösung mit Chf-Alk-(4:1) extrahiert, dieses über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Der erhaltene Rückstand gab im DC 4 Flecke, deren Rf-Werte denjenigen von Lanatosid A und B und Purpureaglykosid A (aus Lanatosid A entstanden) und Purpureaglykosid B (aus Lanatosid B und E entstanden) entsprachen.

Isolierung von Lanatosid A (3). Bei der chromatographischen Aufteilung dieses 4-Komponenten-Gemisches an 15 g SiO_2 liess sich lediglich aus einem Teil der Fr mit Chf-Me-(19:1) ein einheitliches Kristallinat (73 mg) gewinnen, das bei $238-243^\circ$ schmolz und identisch mit Lanatosid A (3)⁷⁾ war.

Untersuchung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes. - *Versuche zur Auftrennung der Primär-glykoside.* - 1. Durch Verteilungschromatographie an mit W (1:1) beladenem Hyflo Supercel als stationärer und mit W-gesättigtem Mek als mobiler Phase [20] konnte keine Auftrennung erzielt werden. Alle Fr enthielten nach DC praktisch dasselbe Gemisch von mindestens 4 KEDDE-(+) Substanzen.

2. Eine Verteilungschromatographie an Kieselgel mit 12,5% W als stationärer und W-gesättigtem Essigester als mobiler Phase [21] ergab eine teilweise Auftrennung des Gemisches, wobei aber immer Mischkristallisate erhalten wurden, die auch nach erneuter analoger Verteilung nie zu einheitlichen Substanzen führte. Zur Prüfung auf Einheitlichkeit im DC bewährte sich am besten die organische Phase des Gemisches von Chf-Me-Bz-W-(6:3:1:1). Die Rf-Werte der Flecke entsprachen jeweils ungefähr denjenigen der Purpureaglykoside A und B.

3. *Isolierung von Substanz A.* Bei einer wie unter 1. durchgeführten Verteilungschromatographie, wobei W-gesättigte Chf-Bu-Gemische als mobile Phase verwendet wurden, liess sich ebenfalls keine völlige Auftrennung der KEDDE-(+) Substanzen erzielen, dagegen gelang es, ein in Me sehr schwer lösliches KEDDE(-) Kristallinat zu isolieren, das nach DC einheitlich war. Aus Me-Chf feine Nadelchen: Substanz A, Smp. $207-214^\circ$; $[\alpha]_D^{23} = -22,4^\circ$ [$c = 1,124$ in Chf-Me-(1:1)]. Enzymatische Spaltung: 10 mg in 4 ml W + 1 ml An + 0,1 ml Me suspendiert, mit 2 mg Enzympräparat E. L. 33-63¹¹⁾ versetzt und 16 Std. bei 37° stehengelassen. Danach war im DC neben dem Fleck der sehr polaren Substanz A der Fleck der weniger polaren Substanz a deutlich sichtbar.

4. Schliesslich wurde noch versucht, durch präparative DC eine Auftrennung der Bestandteile des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes zu erzielen. Da die gewanderten Zonen zu nahe aneinander lagen, blieb auch dieser Versuch erfolglos.

Fermentative Spaltung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes. 13 g Rohextrakt wurden mit 400 ml W unter Erwärmen erst mit 100 ml An, dann mit 8 ml Me versetzt, wodurch erst völlige Lösung erreicht werden konnte. Zu dieser gab man 400 mg Fermentpräparat E. L. 33-63¹¹⁾ (gelöst in 5 ml W). Nach Zugabe von 20 Tr. Toluol wurde unter gelegentlichem Umschwenken bei 37° stehengelassen. Schon wenige Minuten nach der Enzymzugabe wurde die Lösung trübe und nach einigen Std. bildete sich ein weisser Niederschlag, der sich mit der Zeit vermehrte. In regelmässigen Abständen wurden kleine Proben der Fermentierungslösung im DC [System Mek (mit W gesättigt)] untersucht, wobei die den Desgluco-Produkten entsprechenden Flecke ständig grösser wurden. Nach 4 Tagen wurden nochmals 110 mg Enzym (in etwas W gelöst) zugegeben. Nach total 10tägigem Fermentieren war der ursprüngliche pH-Wert von 5,5 auf etwa 4,4 abgesunken. Obwohl nach dieser Zeit noch nicht alle Glucosido-Produkte gespalten waren, wurde die Lösung im Vakuum bei 50° auf etwa 200 ml eingengt, zunächst erschöpfend mit jeweils 250 ml Chf und dann noch gründlich mit Chf-Alk-(4:1) extrahiert. Die mit W gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten organi-

schen Phasen wurden filtriert und im Vakuum zur Trockne gebracht. Erhalten wurden: 4,49 g Chf-Extrakt und 5,25 g Chf-Alk-(4:1)-Extrakt. [Die in Chf-Alk-(4:1) löslichen Anteile gaben nach erneuter Fermentierung wiederum mit Chf extrahierbare Desgluco-Produkte, die nach DC dasselbe Substanzgemisch wie nach der 1. Fermentierung enthielten. Sie wurden zum Nachweis von Acetyldigitoxin (**4**) und Acetylglitaloxin (**12**) benützt (siehe weiter unten).]

Die erschöpfend mit Chf und Chf-Alk-(4:1) extrahierte wässrige Lösung der Enzymspaltung wurde im RV bei 12 Torr und 50–60° zum Sirup eingedampft (enthielt 3,26 g Trockenrückstand). Reduziert FEHLING'sche Lösung. – Nachweis der Glucose als Phenylsazon: eine Probe des Sirups (entsprechend 200 mg Trockensubstanz) wurde mit der Lösung von 0,8 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 1,2 g krist. Na-acetat 10 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Der nach dem Abkühlen erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und aus Alk umkristallisiert: feine, gelbe Nadelchen von Glucosephenylsazon, Smp. 203–205°. – Versuch zur annähernd quantitativen Ermittlung des Glucosegehaltes: aliquote Anteile des Sirups entsprechend jeweils 115 mg Trockenrückstand wurden mit FEHLING'scher Lösung¹⁸) gekocht, das ausgeschiedene Cu₂O bis zur Gew.-Konstanz gegläht und gewogen: 52 mg bzw. 53 mg CuO (159 mg CuO entsprechen 180 mg Glucose).

Hydrolyseversuche: a) eine Probe des Sirups (entsprechend 700 mg Trockenrückstand) wurde in 15 ml 0,1N H₂SO₄ 90 Min. auf 80–85° erhitzt. Durch Ausschütteln mit Chf liessen sich 15 mg eines braunen, amorphen Rückstandes gewinnen, der KEDDE(–) war und deshalb nicht weiter untersucht wurde. – b) Eine weitere, gleich grosse Probe des Sirups wurde in analoger Weise, wie unter a) beschrieben, mit 10-proz. H₂SO₄ hydrolysiert und gab 29 mg mit Chf extrahierbares KEDDE(–) Material.

Untersuchung der Desgluco-Produkte. – 1. *Isolierung von Digitoxin (2).* 5,6 g Chf-Extrakt¹⁸) (aus der Fermentierung) wurden an 120 g SiO₂ chromatographiert. Die Fr 1–8 (mit Chf) enthielten 39 mg KEDDE(–) Material, die Fr 9–28 [mit Chf-Me-(99:1), -(49:1) + und -(19:1)] gaben 1,0 g KEDDE(–) Substanzen, die Fr 29–58 [mit Chf-Me-(9:1) und -(4:1)] 4,2 g KEDDE(+) Rückstände. Die weiteren Fr (bis reines Me) eluierten nur noch wenig Substanz [KEDDE(?)]. Die einzelnen Fr wurden in An gelöst und zur Kristallisation eingeengt. Aus den Fr 33–38 konnte ein Kristallinat (288 mg) gewonnen werden, das im DC [System Chf-Me-(9:1) den Rf-Wert des Digitoxins besass und fast einheitlich war. Durch erneute Aufteilung an 4,5 g SiO₂ konnten aus den ersten Fr 172 mg völlig reines Digitoxin vom Smp. 260–264° erhalten werden; $[\alpha]_D^{20} = +15,5^\circ$ ($c = 1,361$ g in Chf mit 0,5-proz. Alk). Auch das spektrale Verhalten (im UV. und IR.) und die Laufstrecke im Pchr (System KAISER I [5]) zeigte völlige Übereinstimmung mit Digitoxin.

2. *Isolierung von Gitaloxin (10).* Die Eindampfrückstände der bei wiederholter chromatographischer Aufteilung von uneinheitlichem Digitoxin an SiO₂ erhaltenen (späteren) Fr, gaben im DC nach Besprühen mit SbCl₃ und Erwärmen den für Digitoxin typischen Fleck, der aber (im Unterschied zum reinen Digitoxin) im UV. ausserdem eine hellblaue Fluoreszenz aufwies (Gitoxygeninderivat). Die Isolierung dieser dem Digitoxin anhaftenden Verunreinigung wurde mit Hilfe der präparativen Pchr wie folgt durchgeführt: 18 cm breite und 48 cm lange Papierbogen (WHATMAN Nr. 1) wurden 3mal durch eine Lösung von Fmd-An-(1:4) gezogen und 15 Min. hängengelassen. Hierauf wurden 106 mg Digitoxin-Mischkristallinat in 2 ml Chf gelöst, und diese Lösung als Band über die ganze Startlinie von 10 imprägnierten Papierbogen gleichmässig verteilt. Entwicklung absteigend im System KAISER I [Xylol-Mek-(1:1), gesättigt mit Fmd], Laufzeit 2½ Std. Nach Trocknen der Papierbogen bei 100° (10 Min.) wurden aus diesen schmale Kontrollstreifen jeweils an den Rändern und in der Mitte herausgeschnitten, mit SbCl₃ besprüht und erhitzt. An Hand dieser Kontrollstreifen wurden die Papierchromatogramme markiert. Die das Digitoxin enthaltende Zone (unpolarste) sowie die etwas polarere Zwischenzone wurden verworfen. Die polarste Zone wurde herausgeschnitten, die einzelnen Streifen in kleine Schnitzel geschnitten und diese 16 Std. bei 0° in W geweicht. Der Papierbrei wurde dann 4mal mit Chf ausgezogen. Die Chf-Lösungen wurden zur Entfernung des Fmd noch je 3mal mit 100 ml W ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde nochmals in gleicher Weise an 2 Bogen imprägniertem Papier aufgetrennt. Das dann erhaltene Rohprodukt war im Pchr einheitlich und

¹⁸) Diese Methode der Glucosebestimmung ist natürlich nicht spezifisch und gibt zudem nur approximative Werte. Die Vergärungsprobe mit Bäckerhefe ist spezifischer, versagte aber im vorliegenden Fall.

gab aus An-Pe 9 mg völlig reines Gitaloxin; Smp. 256–260°. Die Mischprobe mit authentischem Gitaloxin¹⁵) (Smp. 249–253°) schmolz bei 252–258°. Verseifung einer kleinen Probe mit verd. NH_3 gab Gitoxin (6), das als einheitlicher Fleck im DC nachgewiesen wurde.

3. *Isolierung von Gitoxin (6) und Nachweis einer polaren Substanz GX.* Die Kristallisate aus den Fr 44–48 der obigen Chromatographie waren nach DC praktisch identisch, aber nicht einheitlich. Sie enthielten zur Hauptsache eine unpolare Substanz, die im DC nach dem Besprühen mit SbCl_3 und Erwärmen einen im UV. lebhaft hellblau fluoreszierenden Fleck [27] mit dem Rf-Wert des Gitaloxins gab. Die das Gitoxin enthaltenden Kristallisate (91 mg) wurden mit 6 ml Chf-Me-(19:1) versetzt, erwärmt und von den schwer löslichen Anteilen abfiltriert. Filtrat und Filtrerrückstand waren nach DC praktisch identisch. Trotzdem wurden nur die löslichen Anteile an 2 g SiO_2 chromatographiert, wobei keine Auftrennung des Gemisches erzielt werden konnte. – Präparative DC: 50 mg des Gemisches wurden jeweils als Band auf 5 Kieselgelplatten [Schichtdicke 1,0 mm enthaltend 0,5% Leuchtpigment LS Super (RIEDEL-DE HAËN AG.)] auf der Startlinie aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte im System Chf-Me-(9:1). Nach dem Trocknen der Platten wurden im UV. die auf hellgrün leuchtendem Grund dunkel erscheinenden Bänder (Zonen) markiert. Das obere Band (= Gitoxin) wurde herausgeschabt und das Kieselgel 2mal mit Chf-Me-(1:1) eluiert. (Zwischen dem unteren und oberen Band wurde eine breite, die anderen Zonen etwas überlappende Mittelzone intakt gelassen, um die in der oberen Zone enthaltene Substanz möglichst einheitlich zu erhalten.) Das Eluat der oberen Zone wurde aus Me-Chf kristallisiert und gab 7 mg im DC völlig einheitliches Gitoxin; Smp. 268–273°; Mischprobe mit authentischem Gitoxin 268–274°. Auch die Rf-Werte im Pchr stimmten mit diesem völlig überein. – Das aus der unteren Zone isolierte Material enthielt zur Hauptsache die polare Substanz GX.

Fermentierungsversuch der Lanatoside A und B. Je 1 mg Lanatosid A und B wurden unter den gleichen Bedingungen fermentiert wie der oben beschriebene Chf-Alk-(4:1)-Extrakt. Die Fermentierungsprodukte enthielten nach DC nur die Acetylverbindungen der Desglucolanatoside A und B (= Acetyldigitoxin (4) und Acetylgitoxin (8)).

Nachweis von Acetyldigitoxin (4) und Acetylitaloxin (12). Als Untersuchungsmaterial wurden die 2,3 g Desgluco-Produkte (in Chf lösliche Anteile) verwendet, die durch Nachfermentierung des Chf-Alk-(4:1)-Extraktes (= 4,84 g, siehe Tab. 2) der 1. Fermentierung (siehe oben) erhalten worden waren. Durch Chromatographie an 25 g SiO_2 wurde das Gemisch in 32 Fr aufgeteilt. Aus dem Verdampfungsrückstand von 2 Fr [mit Chf-Me-(96,5:3,5)] konnten aus An 18 mg Kristalle erhalten werden, die nach DC in verschiedenen Systemen einheitlich zu sein schienen. Im Pchr (System KAISER I) gaben diese Kristalle aber 2 Flecke, deren Rf-Werte denjenigen des Acetyldigitoxins (4) und Acetylitaloxins (12) entsprachen. Das durch Verseifung einer Probe des Mischkristallisates in verd. wässrig-methanolischem NH_3 erhaltene Produkt gab im DC (System Chf-Me-(9:1)) und Pchr (System KAISER I) Flecke, deren Rf-Werte denjenigen des Digitoxins (2) und Acetylitaloxins (8) bzw. Gitaloxins (6) entsprachen.

Isolierung von Substanz a nach Fermentierung. Nach Chromatographie an SiO_2 des Chf-Auszugs (0,4 g) der 2. Nachfermentierung (2,3 g, siehe Tab. 2) liess sich nach Eindampfen von 4 Fr [Chf-Me-(19:1)] 53 mg einer im DC einheitlichen Substanz gewinnen, die aus An-Me 30 mg feine Nadelchen vom Smp. 204–210° gab. Durch erneute chromatographische Aufteilung konnte schliesslich der Smp. auf 241–246° gebracht werden. $[\alpha]_D = -23^\circ$ [$c = 1,00$ in Chf-Me-(1:1)]. Die Molekulargewichtsbestimmung (in An, Einwaage ca. 1 mg) mit dem MECHROLAB Osmometer gab den Wert 697 ± 45 .

$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{12}$ (684,8) Ber. C 63,14 H 8,92 O 28,04% Gef. C 63,13 H 8,83 O 27,71%

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den getrockneten Blättern von *Digitalis obscura*, deren Toxizität (an der Katze nach HATCHER-MAGNUS) rund 2mal höher ist als die des Internationalen *D. purpurea*-Standards, konnten die folgenden «genuinen» Glykoside isoliert werden: α - und β -Acetyldigitoxin sowie Lanatosid A. Ein beim Ausschüttlungsverfahren gewonnener Chloroform-Alkohol-(4:1)-Extrakt, der rund 70% der Gesamtoxizität in sich vereinigte, wurde auf enzymatischem Wege partiell abgebaut. Danach konnten

die folgenden Desgluco-Produkte in Kristallen isoliert werden: Digitoxin, Gitoxin, Gitaloxin, Acetyldigitoxin und Acetyl-gitaloxin. Damit kann das mit Hilfe der Papierchromatographie in den Blättern wahrscheinlich gemachte Vorkommen der Lanatoside A, B und E, des Glucogitaloxins, der Purpureaglykoside A und B sowie des Glucogitorosids als gesichert gelten.

Ein als Begleitsubstanz des Gitoxins auftretendes vorläufig als GX bezeichnetes Gitoxigenin-(?)-glykosid konnte nur stark angereichert erhalten werden. Es liess sich nicht mit einem bekannten Glykosid identifizieren.

Da Digoxigeninglykoside in *Digitalis obscura* nicht nachgewiesen werden konnten, nimmt diese in bezug auf die chemische Zusammensetzung ihrer Glykoside eine Mittelstellung zwischen *D. purpurea* L. und *D. lanata* EHRH. ein.

Neben den genannten für *Digitalis*-Arten typischen Inhaltsstoffen wurden zwei unbekannte Glykoside isoliert, die nicht zu den Cardenolid- und vermutlich auch nicht zu den Digitanol-Glykosiden oder den Saponinen zu zählen sind. Sie werden vorläufig als Substanz A bzw. Substanz a (Desgluco-Produkt von A) bezeichnet. Substanz a ist möglicherweise identisch mit dem «Obscuraglykosid» von NOVELLA & LONZANO [2].

Über die in *D. obscura* aufgefundenen – zumindest für die Gattung *Digitalis* – neuen Pflanzenpigmente wird in anderem Zusammenhang ausführlich berichtet werden¹⁹⁾.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. WERNER, Wissenschaftl. Zeitschr. d. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Mathem.-Naturw. Reihe 13, 453 (1964).
- [2] E. C. NOVELLA & V. S. LONZANO, Anales real. Soc. españ. Fisica Quim. (Madrid) 48 B, 893 (1952); Chem. Abstr. 47, 12755e (1953).
- [3] V. S. LONZANO & E. C. NOVELLA, Anales real. Soc. españ. Fisica Quim. (Madrid) 50 B, 315, 679 (1954); Chem. Abstr. 49, 5503b bzw. 445i (1955).
- [4] D. L. KEDDE, Diss. Leiden 1946; Pharmac. Weekbl. 82, 741 (1947); vgl. auch J. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, Biochem. J. 52, 643 (1952). Ausgeführt als Tüpfelprobe auf Papier.
- [5] F. KAISER, Chem. Ber. 88, 556 (1955).
- [6] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 78, 120 (1935); 37, 1134 (1954).
- [7] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 76, 1049 (1933).
- [8] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 76, 1390 (1933).
- [9] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 77, 592 (1934); 35, 1318 (1952); R. TSCHESCHE & B. NIYOM-PORN & H. MACHLEIDT, Chem. Ber. 92, 2258 (1959).
- [10] A. WINDAUS, G. WESTPHAL & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. 61, 1847 (1928).
- [11] A. STOLL & W. KREIS, Helv. 77, 592 (1934); 35, 1318 (1952).
- [12] E. HAACK, M. GUBE, F. KAISER & H. SPINGLER, Chem. Ber. 91, 1758 (1958).
- [13] E. HAACK, F. KAISER & H. SPINGLER, Naturwiss. 42, 441 (1955); *idem*, Chem. Ber. 89, 1353 (1956).
- [14] E. ANLIKER, F. BARFUSS & J. RENZ, Helv. 41, 479 (1958); vgl. Diss. D. KUTTER, Lausanne 1957.
- [15] E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE & H. SPINGLER, Naturwiss. 45, 315 (1958).
- [16] F. KAISER, E. HAACK & H. SPINGLER, Liebigs Ann. Chem. 678, 137 (1964).
- [17] M. PESEZ, Ann. pharmac. franç. 10, 104 (1952) und frühere Lit. daselbst.

¹⁹⁾ Anmerkung bei der Korrektur: CARRERAS [28] hat vor kurzem, was wir leider übersehen haben, mit Hilfe der Papierchromatographie das Vorliegen der folgenden Glykoside in *D. obscura* wahrscheinlich gemacht: Lanatosid A und B, Purpureaglykosid A und B, Digitoxin, Gitoxin, Gitaloxin, Odorosid G, Digitalinum verum, Strosipesid und Verodoxin.

- [18] V. CALCANDI, I. CALCANDI & J. LUNGEANU, *Naturwiss.* **50**, 498 (1963); V. CALCANDI & J. LUNGEANU, *ibid.* **51**, 242 (1964).
 - [19] T. REICHSTEIN & J. VON EUW, *Helv.* **27**, 1181 (1938); H. ROSENMUND & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.* **17**, 176 (1942).
 - [20] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **34**, 108 (1951).
 - [21] A. STOLL, E. ANLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL & J. RENZ, *Helv.* **34**, 1460 (1951).
 - [22] J. VON EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **33**, 666 (1950); W. RITTEL, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **35**, 434 (1952).
 - [23] E. HAACK, F. KAISER & H. SPINGLER, *Naturwiss.* **43**, 130 (1956); **45**, 241 (1958).
 - [24] A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **33**, 76 (1950).
 - [25] E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE & H. SPINGLER, *Naturwiss.* **43**, 301 (1956).
 - [26] A. GAMP, P. STUDER, H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* **18**, 292 (1962).
 - [27] M. PESEZ, *Ann. pharmac. franç.* **8**, 746 (1950).
 - [28] L. CARRERAS, *Farmacognosia (Madrid)* **23**, 1 (1963); *Chem. Abstr.* **61**, 6042h (1964).
-

ψ -Bufarenogin, ein neues Bufadienolid
aus *Ch'an Su* und Umlagerungsprodukt des Arenobufagins
sowie Bemerkung zur Konfiguration des Bufarenogins

Beim Versuch, aus einem Muster der chinesischen Krötengiftdroge *Ch'an Su* Bufarenogin (**1**)²⁾ zu isolieren, erhielt man statt dessen ein neues Bufadienolid, das sich bei dem chromatographischen Trennverfahren genau wie **1** verhielt. Wir geben diesem Bufogenin deshalb den Namen ψ -Bufarenogin (**5**).

Vor einigen Jahren haben REES *et al.* [2] beobachtet, dass aus Arenobufagin (**3**) durch Kontakt mit Al_2O_3 zwei Stoffe entstehen, die im Papierchromatogramm gleiche Laufstrecken und gleiches Verhalten beim Erhitzen mit SbCl_3 wie Bufarenogin (**1**) und Argentinogin (**7**) zeigten. Die Identität dieser beiden aus **3** entstandenen Stoffe ist mangels Substanz nicht auf präparativem Wege sichergestellt worden.

Da uns eine grössere Menge Arenobufagin (**3**) zur Verfügung stand, haben wir die von REES *et al.* durchgeführte Umlagerung von **3** in präparativem Maßstab wiederholt.

Arenobufagin (**3**) wurde in $\text{Me}^3\text{-An}$ (1:1) bei 20° mit etwa der 20fachen Menge Al_2O_3 geschüttelt. Schon nach wenigen Stunden konnte im Dünnschichtchromatogramm das Auftreten einer polareren Substanz nachgewiesen werden⁴⁾. Im Laufe von etwa 24 Stunden hatte sich ein 1:1-Gleichgewicht (Schätzung auf Grund der Fleckengrösse im Dünnschichtchromatogramm) zwischen **3** und der neuen Substanz eingestellt. Das rohe Reaktionsgemisch liess sich durch Chromatographie an SiO_2 in gleiche Teile Ausgangsmaterial **3** und das polarere Umlagerungsprodukt auftrennen. Dieses wurde in (nach Dünnschichtchromatogramm) reinen Kristallen vom Smp. 206–214° und $[\alpha]_D = -61^\circ$ gewonnen. Die Acetylverbindung schmolz bei 137–144° und zeigte $[\alpha]_D = -36^\circ$. Diese Daten stimmen nicht mit den für Bufarenogin (**1**) und seiner Acetylverbindung **2** ermittelten [2] überein, sehr gut dagegen mit denjenigen, die für das aus *Ch'an Su* isolierte ψ -Bufarenogin und seine Acetylverbindung gefunden worden waren. Der direkte Vergleich ergab Identität der beiden Acetylverbindungen. Wird ψ -Bufarenogin (**5**) wie **3** in Me-An 24 Stunden mit Al_2O_3 geschüttelt, so lagert es sich wieder zur Hälfte in **3** um. Die beiden Acetylverbindungen **4** und **6** werden demgegenüber durch Al_2O_3 nicht verändert. Wird ψ -Bufarenogin bei 37° in $\text{Py-Ac}_2\text{O}$ stehengelassen, so bildet sich nur die Diacetylverbindung **6**. Acetylierung bei 90–100°

¹⁾ 31. Mitt. vgl. E. ISELI *et al.* [1].

²⁾ Dieses Bufogenin ist erstmals von REES *et al.* [2] aus dem Giftsekret von *Bufo arenarum* HENSEL und etwas später von HOFER & MEYER [3] auch aus *Ch'an Su* in kleinen Mengen isoliert worden.

³⁾ Abkürzungen siehe Einleitung zum exper. Teil.

⁴⁾ Die Bildung einer weiteren, noch polareren Substanz mit dem Rf-Wert des Argentinogins (**7**) konnte in unseren Versuchen nicht beobachtet werden.

gibt neben **6** auch die Diacetylverbindung **4**⁵⁾. Bei 135° entsteht neben **4** und **6** noch eine unpolarere Substanz mit $\lambda_{\max}$ 300 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 108$), die nicht weiter untersucht wurde. Im Gegensatz zu **5** wird bei der Acetylierung von **3** auch bei hoher Temperatur nur **4** gebildet.

Auch im Dünnschichtchromatogramm unterscheiden sich ψ -Bufarenogin (**5**) und Bufarenogin (**1**) weder durch ihre Laufstrecken noch durch die Farbreaktion mit SbCl_3 , die Acetylverbindungen hingegen zeigen etwas verschiedene Rf-Werte (**6** ist etwas polarer als **2**).

Auffallend ist, dass ψ -Bufarenogin keine⁶⁾, Arenobufagin (**3**) dagegen eine sehr hohe Toxizität besitzt [2].

Konstitution des ψ -Bufarenogins. - REES *et al.* [2] hatten angenommen, dass die durch Al_2O_3 bewirkte Umlagerung des Arenobufagins (**3**) ein Analogon zum Übergang von Sinosid in Caudosid darstelle [9]. Da das Cardenolid Sinogenin [**6**] in seinem tetracyclischen Anteil dem des Arenobufagins (**3**) entspricht, und dem Umlagerungsprodukt Caudosid die Konstitution eines 11-Oxo-12 α -hydroxy-cardenolids zuerteilt wurde [9]⁸⁾, dürfte Bufarenogin ebenfalls ein 11-Oxo-12 α -hydroxy-Steroid sein⁹⁾. Damit stimmen auch die bei der Acetylierung auftretenden Verschiebungen der molekularen Drehung überein (siehe Tabelle 1). Äquatoriale HO-Gruppen an C-11 und C-12 verändern die Drehung im negativen Sinn, axiale im positiven Sinn [12].

Um die räumliche Lage der HO-Gruppe im Ring C von ψ -Bufarenogin (**5**) eindeutig abzuklären, haben wir dessen Acetylverbindung **6** zu der ihr zugrunde liegenden Ätiansäure abgebaut und deren Methylester **17** bereitet. Zu Vergleichszwecken wurden ausserdem die beiden als 11 β -Acetoxy-12-oxo- (**18**), bzw. 11-Oxo-12 β -acetoxy-ätiansäure-methylester (**19**) beschriebenen Verbindungen [7] bzw. [5] hergestellt, sowie 11 α -Acetoxy-12-oxo-ätiansäure-methylester (**16**) [6] durch Abbau von **4**.

Die Oxydation der Seitenkette in den beiden Acetylverbindungen **6** und **4** wurde wie in analogen Fällen mit KMnO_4 in An [13] durchgeführt. Dabei reagierte **6** viel rascher als **4** und gab rund 90% saure Anteile gegenüber etwa 74% bei **4**. Aus den neutralen Anteilen der KMnO_4 -Oxydation von **4** konnte das früher [4] beschriebene 3 β , 11 α -Diacetoxy-12, 20-dioxy-14-hydroxy-5 β , 14 β -pregnan-21-säure-lacton-(21 $\rightarrow$ 14) isoliert werden, während dies bei dem aus **6** erhaltenen Neutralteil misslang! Die Eliminierung der 14 β -ständigen HO-Gruppe in dem aus **6** gewonnenen Ester **11** verlief einheitlich: das Δ^{14} -Produkt **14** wurde in 80-proz. Ausbeute in reinen Kristallen gewonnen. Deingegenüber wies der aus **4** bzw. **10** erhaltene ungesättigte Ester **13** eine

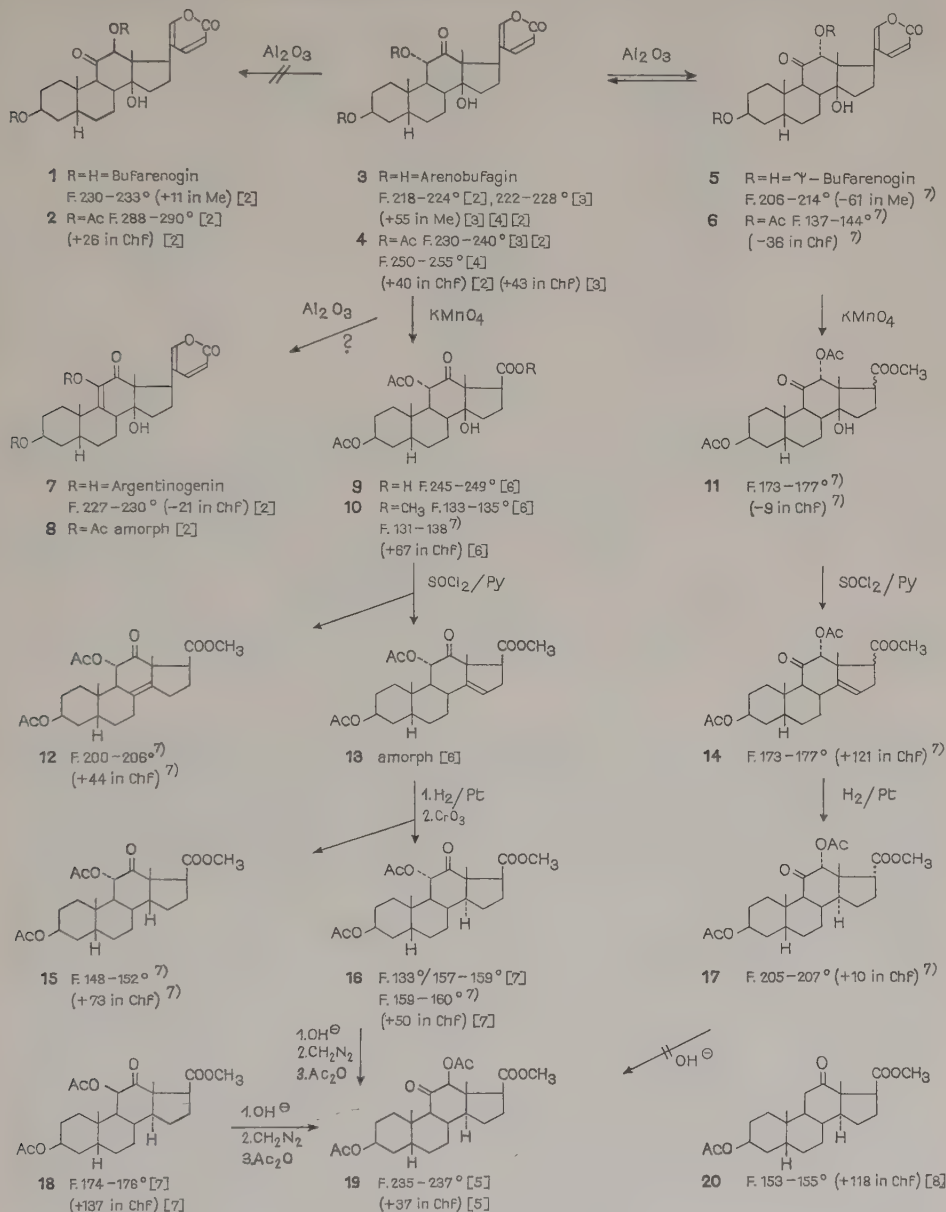
⁵⁾ Wird **5** in Py allein erhitzt, so lässt sich schon nach kurzer Zeit im Dünnschichtchromatogramm das Auftreten von Arenobufagin (**3**) nachweisen.

⁶⁾ Herr Prof. Dr. K. K. CHEN, Indiana University, Indianapolis, hatte die Freundlichkeit, **5** an der Katze zu prüfen, wofür wir ihm an dieser Stelle bestens danken möchten. Die Versuchstiere überlebten Mengen bis 4,925 mg/kg. Die Wirkung höherer Dosen liess sich nicht ermitteln, da **5** zu wenig löslich ist. Auch bei der hier angegebenen höchsten Dosis zeigte das Elektrokardiogramm keine Änderung, womit kein Zweifel bestehen kann, dass ψ -Bufarenogin inaktiv ist.

⁸⁾ Ein Beweis wurde hierfür bisher noch nicht erbracht. Die Struktur der Ketolgruppe im Ring C ist aber gut begründet [9]. Die Umlagerung der 11 α -Hydroxy-12-oxo-Gruppe beim Kontakt mit Al_2O_3 entspricht der von GALLAGHER und anderen [11] untersuchten analogen Reaktion in der Gallensäuren-Reihe.

⁹⁾ Bufarenogin (**1**) ist wahrscheinlich kein einfaches Umlagerungsprodukt aus Arenobufagin (**3**) (siehe dagegen [2]).

Reihe von Nebenprodukten auf, die sich durch Chromatographie abtrennen liessen. Trotzdem blieb **13** – wie bereits früher beobachtet [6] – amorph. Eines der Nebenprodukte konnte in Kristallen gewonnen werden. Dessen Struktur **12** ergibt sich aus



Ac = $\text{CH}_3\text{--}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C--}$; die Zahlen in runden Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in den vermerkten Lösungsmitteln³⁾ an.

7) Siehe exper. Teil.

Tabelle 1. *Physikalische Daten der Substanzen 1–6, 16–19 und 27*

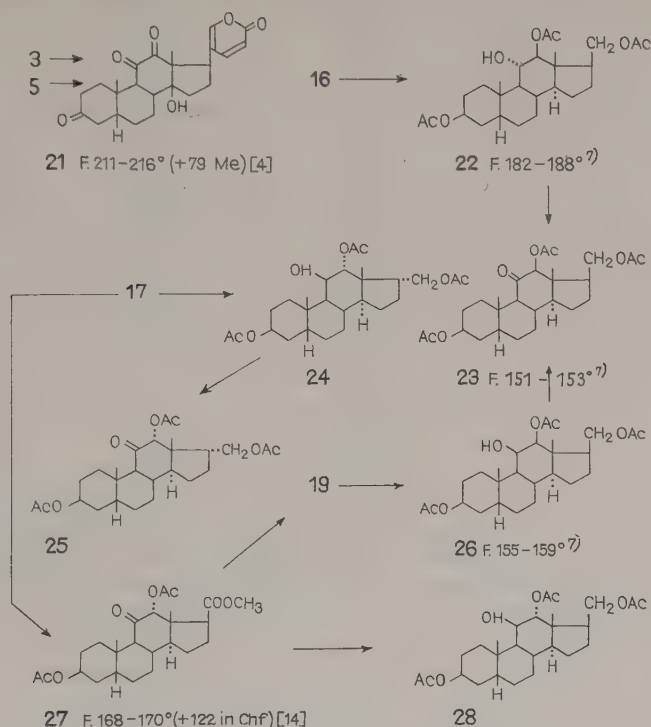
Substanz	Smp.	M_D in CHCl_3	$\lambda_{\max}$ in Al	
			nm	$\log \epsilon$
1	230–233	+ 46 (Me)	298	3,78
2	288–290	+ 130		
3	218–224	+ 229 (Me)	296	3,77
4	230–240	+ 200		
5	206–214	– 254 (Me)	298	3,77
6	137–144	– 180		
16	159–160	+ 226	280–282	1,74
17	205–207	+ 43	296–298	1,70
18	167–171	+ 622	297–300	2,03
19	225–235	+ 165	292–294	1,50
27	168–170	+ 546	306	1,82

der Bildungsweise, dem Molekel-Ion im Massenspektrum bei 446 m/e und dem Fehlen eines Vinylprotons (im PR.-Spektrum) sowie dem zum Dublett aufgespaltenen Signal des (C-11 β)-H ($J \sim 10$ Hz) (siehe auch Tab. 2). Das Hydrierungsprodukt von **14** gab im Dünnschichtchromatogramm nur *einen* Fleck (neben Spuren von nur im UV.-Licht sichtbaren Verunreinigungen) und der Ester **17** konnte in guter Ausbeute kristallin gewonnen werden. **13** gab bei der Hydrierung ein Gemisch, das im Dünnschichtchromatogramm vier etwa gleich grosse Flecke identischer Farbindensität erkennen liess, die sich nach der Dehydrierung mit CrO_3 auf zwei reduzierten. Durch Chromatographie wurde der Ester **16** und in geringer Menge auch der isomere Ester **15** in Kristallen gewonnen.

Alle vier möglichen 11-12-Acetoxyketone der 5 β -Ätiansäurereihe sind bekannt [5] [7] [6] [14]. Aus dem oben Ausgeführten konnte geschlossen werden, dass der hier aus ψ -Bufarenogin erhaltene Abbauester mit der vor kurzem von TOBIAS [14] als 3 β ,12 α -Diacetoxy-11-oxo-5 β -ätiansäure-methylester bezeichneten Substanz identisch sein müsste, was aber nicht der Fall war. Somit muss mindestens bei einem dieser 5 isomeren Ester eine Umlagerung eingetreten sein.

Zuordnung der verschiedenen Ketole. – Arenobufagin (**3**) besitzt eine 17 β -Seitenkette. Dafür ist besonders das beim KMnO_4 -Abbau sich bildende (21 $\rightarrow$ 14)-Ketolacton beweisend [4]. Da sowohl **3** als auch ψ -Bufarenogin (**5**) mit CrO_3 - H_2SO_4 -An [15] zum selben Triketon **21** [4] dehydriert werden, muss ψ -Bufarenogin (**5**) ebenfalls eine 17 β -Seitenkette besitzen. – Der saure, oxydative Abbau des (21 $\rightarrow$ 14)-Ketolactons aus Di-O-acetylarenobufagin (**4**) gibt **9** bzw. den Ester **10**, der auch aus den sauren Anteilen des Permanganatabbaus von **4** erhalten wird. Damit sollte in **10** die Seitenkette an C-17 die β -Konfiguration beibehalten haben, und ebenso in den aus **10** bereiteten Estern **12**, **15** und **16**. **16** geht durch LiAlH_4 -Reduktion und anschliessende Acetylierung in die 3,12,20-Tri-O-acetylverbindung **22** über, aus der bei der Dehydrierung das Keton **23** entsteht. Dieses ist nach Dünnschichtchromatogramm (in drei Systemen) und PR.-Spektrum identisch mit dem auf gleiche Weise aus **19** über **26** bereiteten Keton **23**. Damit besitzen **16** und **19** (sowie **18**) eine 17 β -ständige Ester-

gruppe^{9a}). Die räumliche Lage (β) der Acetoxy-Gruppe an C-12 wird durch das verbreiterte Singulett (Breite bei halber Höhe $\sim 2,7$ Hz) des axialen (α) Protons an C-12



bewiesen [16]. Bei den Ätiansäureestern **17** und **27** besitzt das C-12-Proton lediglich eine Breite von 1,3 bzw. 1,0 Hz bei halber Signalhöhe, womit in **17** und **27** eine 12 α -Acetoxy-Gruppe vorliegt. Offen bleibt, in welcher der beiden Verbindungen die Estergruppe an C-17 α - bzw. β -ständig orientiert ist. Nach ZÜRCHER [17] sind in den PR.-Spektren die Übergänge von einer 17 β - nach einer 17 α -COOCH₃-Gruppe mit einer Verschiebung des C-18-Methyl-Signals von etwa 0,21 ppm verbunden. Dieser Wert stimmt für **17** und **27** nicht in der Grösse, aber in der Richtung überein, wenn **17** eine 17 α - und **27** eine 17 β -orientierte Seitenkette besitzt. Die Additivität der Verschiebungen ist bei der Häufung von funktionellen Gruppen, vor allem wenn noch ungesättigte Funktionen dazukommen, nicht mehr gegeben [18]. Etwas anders sollten die Verhältnisse in den aus **17**, **19** und **27** bereiteten Triacetylverbindungen **24**, **26** und **28** sein – die Stereochemie an C-11 ist in **22**, **24**, **26** und **28** durch PR.-Spektroskopie (Entkopplungsexperimente) gesichert – da diese nur noch gesättigte Funktionen am Steroidgerüst aufweisen. Vergleicht man nun wie oben die chemischen Verschiebungen in diesen Verbindungen, so ergibt sich hier auch ein quantitativ besseres Ergebnis: der Unterschied zwischen den C-18-Methyl-Signalen in **24** (1,18 ppm) und in **26**

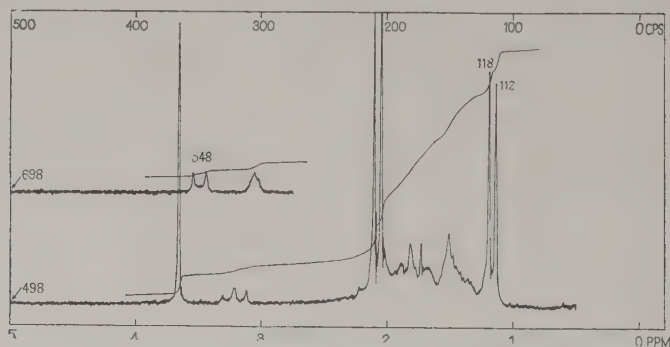
^{9a}) SCHINDLER [5] hatte beim Abbau von Sarmutogenin neben **19** auch 3 β , 12 β -Diacetoxy-12, 20-dioxo-14-hydroxy-5 β , 14 β -pregnan-21-säure-lacton (**21** $\rightarrow$ **14**) erhalten, womit die Stereochemie an C-17 bei **19** bewiesen ist.

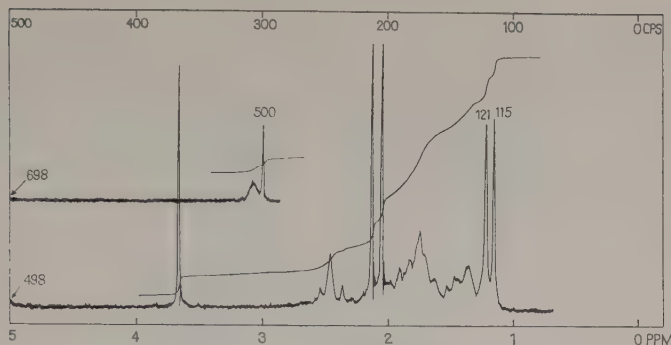
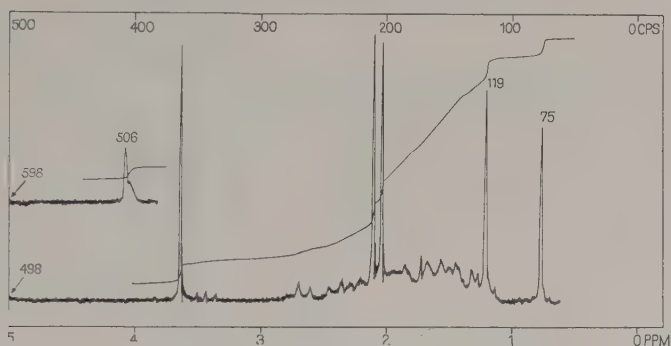
Tabelle 2. Zuordnung der H-Atome in den PR.-Spektren

Substanz	(C-11)-H	(C-12)-H	(C-18)-Methyl	(C-19)-Methyl
2	—	4,83 (S)	0,65	1,24
4	5,38 (D, 11)	—	0,96	1,13
6	—	5,11 (S)	0,98	1,18
12	5,42 (D, 10)	—	1,337	1,165
15	5,37 (D, 10)	—	1,265	1,125
16	5,48 (D, 10)	—	1,124	1,181
17	—	5,00 (S)	1,145	1,21
18	5,16 (D, 3)	—	1,165	1,165
19	—	5,06 (S)	0,75	1,194
20	—	—	1,065	1,105
22	—	4,72 (D, 9)	0,75	1,09
23	—	—	0,66	1,20
24	—	4,65 (D, 3,5)	1,18	1,26
24 in C ₆ D ₆	3,71 (T, 3)	4,71 (D, 3,5)	1,21	1,23
26	—	4,67 (D, 3,3)	0,96	1,22
26 in C ₆ D ₆	4,02 (T, 2,5)	4,68 (D, 3,3)	0,89	1,37
27	—	4,70 (S)	0,65	1,26
28	—	4,82 (D, 2,8)	0,96	1,21
28 in C ₆ D ₆	3,82 (T, 2,8)	4,91 (D, 2,8)	0,90	1,27

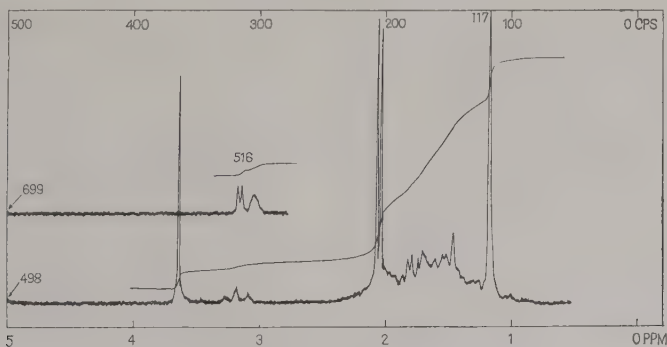
Aufgenommen in CDCl₃, chemische Verschiebung in ppm bezogen auf Tetramethylsilan = 0. S = Singulett, D = Dublett, T = Triplett. – Zahlen in Klammern = Kopplungskonstanten in cps. Die nach dem Entkoppeln gemessenen Kopplungskonstanten zwischen (C-11)-H und (C-9)-H der in C₆D₆ aufgenommenen Spektren sind in der zweiten Spalte aufgeführt.

(0,96 ppm) und **28** (0,96 ppm) ist jetzt mit 0,22 ppm kleiner geworden und weist auch hier auf einen 17 α -Substituenten in **24** (bzw. **17**) sowie β -Substituenten in **26** (bzw. **19**) und **28** (bzw. **27**) hin. Einen weiteren Beweis für diese Zuordnung stellen die chemischen Verschiebungen des (C-12)-H in **24**, **26** und **28** dar. Es ist bekannt, dass auch in Polyolen, wie z. B. Zuckern, die Regel gilt, dass axiale Protonen gegenüber äquatorialen im PR.-Spektrum nach höherem Feld verschoben sind [19]. In **26**, dessen Struktur ausser Frage steht, liegt das Signal des (C-12 α)-H bei 4,67 ppm. Die Verbindungen **24** und **28** besitzen beide ein äquatoriales (β -ständiges) (C-12)-H, dessen Signal bei niedererem Feld als bei **26** erscheinen sollte, wenn der Substituent an C-17 gleiche

Fig. 1. PR.-Spektrum (100 MHz) des Esters **16**

Fig. 2. PR.-Spektrum (100 MHz) des Esters **17**Fig. 3. PR.-Spektrum (100 MHz) des Esters **19**

Lage einnimmt. Nun findet sich das (C-12)-H-Signal in **24** tatsächlich bei 4,65 ppm (also bei höherem Feld als in **26**!) und in **28** bei 4,82 ppm. Somit passen nur **26** und **28** zueinander, die beide einen 17 β -Substituenten aufweisen, während ein 17 α -Substituent wiederum **24** und damit **17** zugesprochen werden muss. Obwohl wir die ORD.-Kurven (siehe Fig. 7) von **17** nicht deuten können, sei erwähnt, dass die Verbindungen **16**, **19**, **18**, **15**, **27** alle einen positiven COTTON-Effekt zeigen, während **17** einen negativen aufweist, also auch hier ein abweichendes Verhalten zeigt.

Fig. 4. PR.-Spektrum (100 MHz) des Esters **18**

Da wir **16**, **17**, **19** und **27** (sowie **18**) miteinander verknüpfen konnten (siehe Formeln S. 1996), ist die 14α -Konfiguration in allen Verbindungen bewiesen [14]. Diese ist beim Ester **17** bemerkenswert, da nach den hier mitgeteilten Ergebnissen und Ableitungen der Δ^{14} -Ester **14**, aus dem **17** durch Hydrierung entsteht, eine 17α -Seitenkette haben sollte, die bei der Hydrierung Anlass zur Bildung des entsprechenden

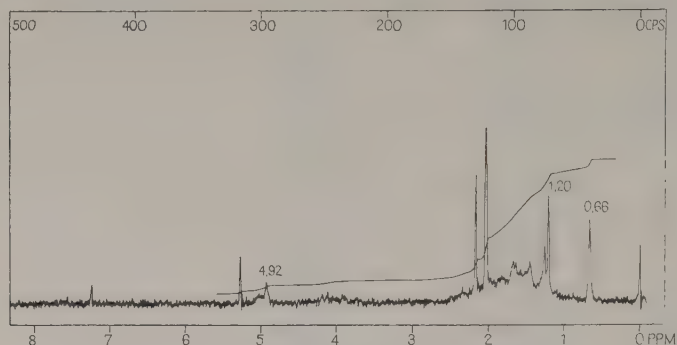


Fig. 5. PR.-Spektrum (60 MHz) des Esters **23**

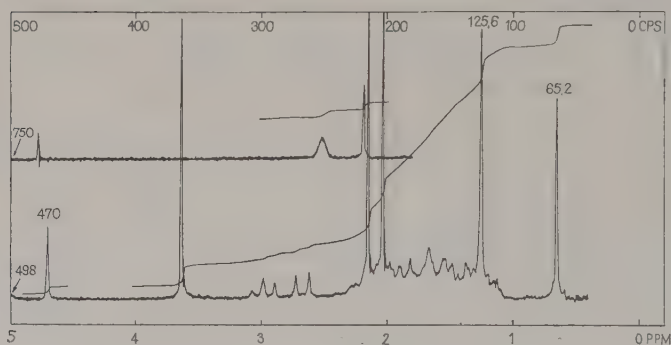
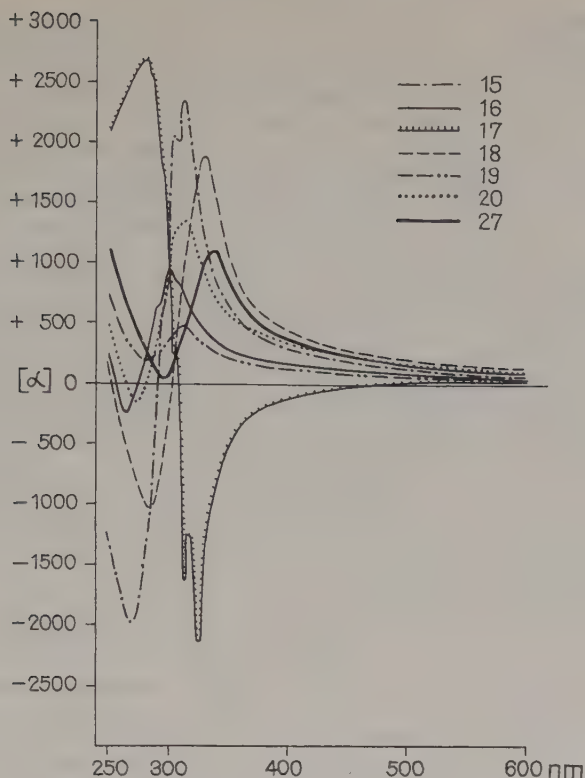


Fig. 6. PR.-Spektrum (100 MHz) des Esters **27**

14β -Derivates geben müsste [20]. Die Hydrierung von Δ^{14} -Verbindungen mit 17β -Seitenkette gibt fast ausschliesslich 14α -Derivate, wenn der Ring C keinen Substituenten trägt, andernfalls kann die Bildung von 14β -Verbindungen begünstigt werden [21]. Beim Ester **14** scheint sich dieser dirigierende Effekt der am Ring C befindlichen Substituenten so stark auszuwirken, dass die Hydrierung stereospezifisch zum (unerwarteten) 14α -Derivat führt. – Versuche, die abklären sollen, auf welcher Stufe zwischen **5** und **17** die Umlagerung an C-17 stattfindet, sind im Gange.

Zur Konfiguration des Bufarenogins. – Bufarenogin (**1**) ist isomer mit Arenobufagin (**3**) [2] und damit auch mit ψ -Bufarenogin (**5**). Das PR.-Spektrum der Acetylverbindung **2** (siehe Tab. 2) zeigt das (C-12)-Proton als verbreitertes Singulett bei 4,83 ppm. (Signalbreite bei halber Höhe 2,3 Hz.) Dies beweist – wie auch bei **19** [24] – ein axiales (α) Proton an C-12. Über die Stereochemie an C-17 in (**1**) werden wir demnächst berichten.

Fig. 7. ORD.-Kurven der Ester **15–19**, **20** und **27**

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Die Massen-, PR.- und ORD.-Spektren wurden in den Laboratorien der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel, aufgenommen. Wir möchten den Herren Dres. G. ENGLERT, W. VETTER und F. BURKHARDT sowie den Herren P. CASAGRANDE und B. MEIER für die Aufnahme dieser Spektren bestens danken.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze bis $200^\circ \pm 2^\circ$, darüber etwa $\pm 3^\circ$. – Zur Chromatographie diente, wenn nichts anderes vermerkt, Kieselgel MERCK, 0,05–0,20 mm = SiO_2 . – Als Lösungsmittelsystem für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde, wo nichts anderes angegeben, Pe-Bz-An-(1:1:1) verwendet. Um Rf-Werte von etwa 0,5 zu erhalten, wurde je nach dem in einem Vorversuch ermittelten Ergebnis die Menge des An variiert. Zur Sichtbarmachung der gewanderten Substanzen wurden die Dünnschicht-Platten erst mit H_2SO_4 -Al-(1:1) besprüht und hierauf auf etwa 100° erhitzt. Die Molekulargewichte (MG) wurden massenspektroskopisch bestimmt. Die ORD.-Spektren wurden in Dioxan bei 25° registriert. Die PR.-Spektren sind auf einem VARIAN A-60 oder HR 100 in CDCl_3 (bzw. C_6D_6) mit Tetramethylsilan als internem Standard aufgenommen.

Abkürzungen: AcOH = Eisessig, Ac_2O = Acetanhydrid, Ä = Diäthyläther, Al = 95-proz. Äthanol, An = Aceton, Bz = Benzol, Chf = Chloroform, DMF = Dimethylformamid, E = Essigester, Fr = Fraktion(en), Me = Methanol, ML = eingedampfte Mutterlauge(n), Pe = Petroläther, Pn = Pentan, Py = Pyridin, THF = Tetrahydrofuran, W = Wasser.

I. ψ -Bufarenogin (5). – a) *Aus Ch'an Su.* 23 g eines Chf-Extraktes aus *Ch'an Su* (entsprechend 100 g *Ch'an Su*-Droge) wurden an 400 g SiO_2 chromatographiert. Die Eindampfrückstände der mit Chf-Me-(97:3) gewonnenen Fr 72–79 enthielten nach DC (Chf-Me-(9:1)) Telocinobufagin, ψ -Bufarenogin und Gamabufotalin. 700 mg dieses Gemisches wurden im präparativen DC (Kieselgel CAMAG D/5, mit 0,5% Leuchtpigment Ls Super RIEDEL-DE HAËN, Schichtdicke 1,0 mm, System Chf-Me-(9:1), Entwicklungsdauer 4–5 Std.) auf 35 Platten (20×20 cm) aufgetrennt. Die im UV.-Licht (254 nm) als dunkelblaue Bänder auf hellgrün fluoreszierendem Untergrund erscheinenden Zonen wurden markiert, einzeln ausgekratzt und das Kieselgel mehrmals mit je 5 ml Chf-Me-(4:1) in der Wärme extrahiert: 377 mg rohes Telocinobufagin, 114 mg rohes ψ -Bufarenogin und 130 mg rohes Gamabufotalin. Das ψ -Bufarenogin enthielt noch Telocinobufagin und Gamabufotalin. Zur weiteren Reinigung wurden die 114 mg rohes ψ -Bufarenogin an 3 g SiO_2 chromatographiert. Die mit Chf-Me-(99:1) gewonnenen Fr 6–14 gaben nach dem Eindampfen 55 mg Rückstand. Aus Me-Ä 15 mg Nadeln vom Smp. 195–202°; $[\alpha]_D^{25} = -53,1^\circ$ ($c = 1,03$ in Me). Nach DC nicht ganz einheitlich. *Acetylierung.* 15 mg ψ -Bufarenogin wurden in 0,5 ml Py gelöst, mit 0,25 ml Ac_2O versetzt und 16 Std. bei 37° stehengelassen. Unter mehrmaliger Zugabe von Bz wurde im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand gab aus Me-Ä prismatische Kristalle vom Smp. 141–145°. Enthielt nach DC noch wenig einer Verunreinigung, sonst aber identisch mit **6**. Misch-Smp. mit dem aus der Umlagerung von **3** erhaltenen **6**: 142–145°.

b) *Aus Arenobufagin (3).* – 1) *Isolierung von Arenobufagin aus Ch'an Su.* 14 g rohes Arenobufagin¹⁰⁾ wurden an 250 g SiO_2 chromatographiert (Fr zu je 100 ml). Mit Chf-Bz-(4:1), Chf und Chf mit 0,5%, 1%, 1½% und 2% Me (total 33 Fr) wurde nichts eluiert. Erst Chf-Me-(97,5:2,5) löste in 6 Fr etwa 7 g Substanz von der Säule, daraus 3,2 g Kristalle (Nadeln) von **3**. Nach dem Umlösen aus An-Me 2,58 g reines **3** vom Smp. 219–226°.

2) *Umlagerung von 3 in 5.* 1,268 g **3** wurden in 70 ml An-Me-(1:1) gelöst, mit 20 g Al_2O_3 CAMAG neutral (Aktivität I nach BROCKMANN) versetzt und 43 Std. in verschlossenem Kolben bei 20° geschüttelt. Hierauf wurde vom Al_2O_3 abfiltriert, mit An-Me-(1:1) gewaschen und die vereinigten Lösungen im Vakuum eingedampft. Rückstand in 70 ml Chf aufgenommen, 3mal mit je 70 ml W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft ergab den 1. Extrakt. Die vereinigten Waschwässer wurden mehrmals mit Chf extrahiert, das Chf über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert, zum 1. Extrakt gegeben und mit diesem im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab im DC (Chf-Me-(9:1) oder An-Bz-Pe-(1:1:1)) etwa 2 gleich grosse, braungelbe Flecke. Dieses Gemisch wurde an 25 g SiO_2 chromatographiert (Fr zu je 40 ml). Fr 1–16 [Chf und Chf-Me-(99:1)] gaben keine Eindampfrückstände. Chf-Me-(88:1) (Fr 17–23) eluierte 588 mg reines **3**, Chf-Me-(48:1) (Fr 24–27) 221 mg Gemisch (etwa 1:1) von **3** und **5** und die Fr 28–34 587 mg rohes **5**, das nach DC noch Spuren von **3** enthielt (nur unter dem UV.-Licht (350 nm) sichtbar). Aus An-Ä 514 mg **5**, feine Nadeln vom Smp. 185–210°, nach DC einheitlich. 145 mg davon wurden aus An-Me-(1:1) umkristallisiert: 83 mg grobe Prismen, Smp. 206–214°; $[\alpha]_D^{25} = -61,3^\circ$ ($c = 1,145$ in Me).

II. Umlagerungsversuche an Al_2O_3 . – a) *Mit ψ -Bufarenogin (5).* 40 mg **5** wurden unter den gleichen Bedingungen wie unter I, b), 2) 68 Std. mit Al_2O_3 geschüttelt. Das Reaktionsprodukt gab im DC zwei gleich starke Flecke, die den von **3** bzw. **5** entsprachen. Nach Acetylierung des Gemisches in Py- Ac_2O bei 37° wurde an SiO_2 chromatographiert: 10 mg reines **4**, 9 mg Gemisch von **4** und **6** und 11 mg nicht ganz reines **6**.

b) *Mit Di-O-acetyl-arenobufagin (4).* 42 mg **4** wurden wie oben beschrieben 42 Std. mit Al_2O_3 geschüttelt. Die Aufarbeitung gab reines **4**, das nach DC keine Spur von **6** enthielt.

c) *Mit Di-O-acetyl- ψ -bufarenogin (6).* Ein mit 17 mg **6** wie unter a) durchgeführter Versuch zeigte, dass auch diese Acetylverbindung durch Al_2O_3 keinerlei Umlagerung erfährt.

III. Acetylierungsversuche. – a) *Mit ψ -Bufarenogin (5).* – 1) *Bei 37°: Di-O-acetyl- ψ -bufarenogin (6).* 570 mg **5** vom Smp. 192–203° wurden in 5,7 ml Py gelöst, mit 3,4 ml Ac_2O versetzt und 17 Std. bei 37° stehengelassen. Hierauf wurde unter mehrmaligem Zufügen von Bz bei 40° im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand, der im DC neben einem grossen Fleck noch einen

¹⁰⁾ Dieses bestand aus Eindampfrückständen von Fr, die nach DC reichliche Mengen von Arenobufagin enthielten und aus einer Reihe von Chromatographien von Chf-Extrakten aus *Ch'an Su* stammten.

sehr schwachen mit geringerem Rf-Wert gab, wurde an 12 g SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Bz-(7:3) (7 Fr) und Chf (5 Fr) eluierte Substanz wurde verworfen. Die weiteren Eluate mit Chf (8 Fr) Chf-Me-(199:1) (10 Fr) enthielten total etwa 650 mg Material. Aus An-Ä 548 mg prismatische Kristalle (reine Diacetylverbindung **6**), Smp. 130–145°. Nach dem Umlösen aus An-Ä stieg der Smp. auf 137–144°; $[\alpha]_D^{23} = -35,5^\circ$ ($c = 1,12$ in Chf). MG = 500, C₂₈H₃₈O₈.

2) Bei 90°: Di-O-acetyl-*p*-bufarenogin (**6**) und Di-O-acetylarenobufagin (**4**). 30 mg **5** wurden in 1,0 ml Py gelöst, mit 0,7 ml Ac₂O versetzt und 1 Std. auf 90° erhitzt. Hierauf wurde das Py und Ac₂O im Vakuum (unter Zusatz von Bz) verdampft. Der Rückstand gab im DC (Pe-Bz-An-(1:1:1)) neben einem starken Fleck von **6** einen schwächeren von **4**.

3) Bei 135°: Di-O-acetyl-*p*-bufarenogin (**6**), Di-O-acetylarenobufagin (**4**) und ein unbekanntes Bufadienolid. 400 mg **5** vom Smp. 211–220° wurden in 3,5 ml Py gelöst, auf 100° erwärmt, bei dieser Temperatur mit 2 ml Ac₂O versetzt und 3½ Std. auf 130° erhitzt. Nach Abdampfen des Py und Ac₂O im Vakuum (unter mehrmaligem Zufügen von Bz) wurde ein Rückstand erhalten, der im DC (Pe-Bz-An-(1:1:1)) 3 Flecke gab. Das rohe Acetylierungsprodukt wurde an 10 g SiO₂ aufgetrennt. Mit Chf (1 Fr) wurde die unpolare Substanz (56 mg) eluiert. Aus An-Ä feine Nadelchen einer unbekannten Substanz vom Smp. 219–224°. Das UV.-Spektrum ist im theoret. Teil erwähnt. — Die nächsten 2 Fr enthielten zur Hauptsache **4** (total rund 180 mg). Aus An 70 mg einheitliches **4** vom Smp. 245–253°; $[\alpha]_D^{23} = +45^\circ$ ($c = 1,3$ in Chf). — Die folgenden 9 Fr mit Chf gaben total 210 mg Rückstand, der nach DC praktisch nur aus **6** bestand.

b) Mit Arenobufagin (**3**) bei 135°: Di-O-acetylarenobufagin (**4**). 43 mg reines **3** wurden in 0,8 ml Py gelöst, 5 Min. auf 100° erwärmt, bei dieser Temperatur mit 0,4 ml Ac₂O versetzt und hierauf 3 Std. auf 130–135° erhitzt. Nach Wegdampfen des Py und Ac₂O im Vakuum wurde der Rückstand im DC untersucht und gab hierbei nur einen Fleck, der in seinem Rf-Wert dem von **4** entsprach. Im UV.-Licht wurde ausserdem noch ein sehr schwacher Fleck einer polareren Substanz sichtbar, deren Rf-Wert mit dem von **6** übereinstimmte.

IV. Abbau von Di-O-acetylarenobufagin (**4**). — a) 3β,11α-Diacetoxy-12-oxo-14-hydroxy-5β,14β,17α-H-ätiensäure-methylester (**10**). Die KMnO₄-Oxydation wurde wie früher [4] beschrieben durchgeführt. Es wurden aus 846 mg **4** 566 mg saure und 188 mg neutrale Anteile (enthielt 3β,11α-Diacetoxy-12,20-dioxo-14-hydroxy-5β,14β-pregnan-21-säure-lacton-(21 → 14)) erhalten. Die sauren Anteile gaben nach Methylierung mit ätherischem CH₃N₂ und Chromatographie an SiO₂ 281 mg reine Kristalle (Plättchen) des Esters **10**, Smp. 131–138°, und 120 mg krist. ML. 132 mg Material blieb ölig.

b) **10** aus 3β,11α-Diacetoxy-12,20-dioxo-14-hydroxy-5β,14β-pregnan-21-säure-lacton-(21 → 14). 293 mg nach DC relativ reines Ketolacton (siehe oben unter a) wurden in 5 ml AcOH gelöst, mit 2 ml 30-proz. H₂O₂ versetzt, 24 Std. bei 20° und nach Zugabe weiterer 3 ml 30-proz. H₂O₂ noch 50 Std. bei 37° stengelassen. Im Vakuum (bei 25°) unter Zusatz von Bz sowie Chf zur Trockene eingedampft und wie üblich aufgearbeitet: 230 mg Säure, die mit ätherischer CH₃N₂-Lösung verestert und in Py-Ac₂O nachacetyliert wurde. Nach DC identisch mit **10**, das aus den sauren Teilen des KMnO₄-Abbaus von **4** erhalten worden war.

c) 3β,11α-Diacetoxy-12-oxo-Δ¹⁴-5β,17α-H-ätiensäure-methylester (**13**) und 3β,11α-Diacetoxy-12-oxo-Δ⁸⁽¹⁴⁾-5β,17α-H-ätiensäure-methylester (**12**) aus **10**. 661 mg des Esters **10**, Smp. 131–138°, wurden in 1 ml Py gelöst, auf –10° abgekühlt und mit 1,1 ml einer gekühlten Lösung von SOCl₂-Py-(1:2) versetzt. Es wurde zunächst 2 Std. bei 0°, dann noch 30 Min. bei 20° stengelassen. Nach Zerlegung des abgekühlten Reaktionsgemisches mit kleinen Eisstückchen wurde mit 10 ml W versetzt und mit 20 ml Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Phasen wurden in üblicher Weise mit verd. HCl und W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand (662 mg) gab im DC (Bz-Pe-An-(1:1:1)) 3 Flecke (Intensität der Flecke etwa 8:2:1). Durch Chromatographie an SiO₂ konnte (mit Bz-Chf-(1:4) eluiert) die dem Hauptfleck entsprechende Substanz als einheitliches Produkt (480 mg) erhalten werden. Dieses blieb amorph. Die späteren Eluate (mit Bz-Chf-(1:4)) (total 158 mg) gaben nach dem Eindampfen einen farblosen Sirup. Aus An-Ä 25 mg Kristalle (Prismen) **12**, Smp. 200–206° und $[\alpha]_D^{23} = +44,4^\circ$ ($c = 1,0$ in Chf). Im DC rein und polarer als **13**. Das IR.-Spektrum lässt keine einer Doppelbindung zukommende Bande erkennen. Die C(NO₂)₄-Probe in wenig Chf war negativ. MG = 446, C₂₅H₃₄O₇.

d) 3β,11α-Diacetoxy-12-oxo-5β,14β,17α-H-ätiensäure-methylester (**15**) und 3β,11α-Diacetoxy-12-oxo-5β,14α,17α-H-ätiensäure-methylester (**16**) aus **13**. 230 mg amorpher reiner Ester **13** wurden

in 10 ml Me mit 100 mg PtO_2 und 12 Tropfen AcOH in der Schüttelbirne bei 20° hydriert. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wurde das Filtrat im Vakuum zur Trockene gebracht, der Rückstand (im DC 4 Flecke) in 11 ml An gelöst, auf 0° abgekühlt und mit 0,65 ml KILIANI-Mischung [15] versetzt. Anschliessend wurde noch 10 Min. bei 20° stehengelassen, mit 8 ml W und etwas Na-Acetat versetzt, im Vakuum vom An befreit und die verbliebene wässrige Lösung 3mal mit je 25 ml Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Phasen wurden der Reihe nach mit eisgekühlter Sodalösung und 15 ml W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab im DC nur noch 2 Flecke. Er wurde an 8 g Al_2O_3 (regeneriert [22]) in 11 Fr aufgeteilt. Fr 1–5 (Bz-Pe-(4:1) und Bz) gaben 85 mg Eindampfrückstand. Aus Ä-Pe 25 mg Kristalle von **15**. Nach dem Umlösen aus Ä-Pe 23 mg Prismen vom Smp. 148–152°; $[\alpha]_D^{24} = +72,6^\circ$ ($c = 0,98$ in Chf). ORD.: siehe Fig. 7; $c = 0,102$; 25°. MG = 448, $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7$. Aus den Fr 6–7 (Bz) liessen sich 110 mg Substanz gewinnen. Aus Ä-Pe 68 mg Prismen von **16**, Smp. 159–160°; $[\alpha]_D^{25} = +50^\circ$ (in Chf). ORD.: siehe Fig. 7; $c = 0,098$; 25°. MG = 448, $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7$. PR.-Spektrum siehe Fig. 1.

V. Abbau von Di-O-acetyl- ψ -bufarenogin (6). – a) $3\beta, 12\alpha$ -Diacetoxy-11-oxo-14-hydroxy-5 β , 14 β , 17 ξ -ätiänsäure-methylester (**11**) aus **6**. 416 mg **6** vom Smp. 137–144° wurden in An gelöst und mit 450 mg fein gepulvertem KMnO_4 in kleinen Portionen versetzt, wobei zunächst sofort Reduktion zu MnO_2 eintrat (ohne merkbare Erwärmung der Reaktionslösung). Nach 1 Std. (auf der Schüttelmaschine) war das zugesetzte KMnO_4 völlig entfärbt. Eine weitere Zugabe von 45 mg KMnO_4 war noch nach 3 Std. nicht ganz verbraucht. Nach dieser Zeit wurde im Vakuum zur Trockene gebracht, der Rückstand fein zerrieben, mit 20 ml 1 N H_2SO_4 versetzt (kongosauer) und 4mal mit je 20 ml Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Phasen wurden der Reihe nach über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der so erhaltene Rückstand (420 mg) wurde in 15 ml Chf-Ä-(4:1) gelöst und diese Lösung 3mal mit je 10 ml 2 N Sodalösung extrahiert. Übliche Aufarbeitung gab 19 mg (5,1%) Neutralteil. Die alkalischen Auszüge wurden mit 2 N H_2SO_4 kongosauer gemacht und mit Chf-Ä-(4:1) ausgeschüttelt. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 336 mg (90%) saure Anteile erhalten. Die freie Ätiänsäure von **11** liess sich nicht kristallisieren. Es wurden daher 320 mg in 0,5 ml Ä und 6 Tropfen Me gelöst, tropfenweise mit ätherischer CH_2N_2 -Lösung versetzt und 30 Min. stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum zur Trockene gebracht, der Rückstand in 0,5 ml Py gelöst, mit 0,1 ml Ac_2O versetzt, 22 Std. bei 37° stehengelassen und dann unter mehrmaliger Zugabe von Bz im Vakuum eingedampft. Aus dem rohen Acetylierungsprodukt konnten nach Chromatographie an SiO_2 (aus den Fr mit Chf-Bz-(4:1)) 202 mg roher Ester **11** gewonnen werden. Aus Ä-Pe 141 mg Kristalle (feine, kleine Nadeln), Smp. 168–176°, nach dem Umlösen aus Ä-Pe Smp. 173–177°; $[\alpha]_D^{24} = -9,1^\circ$ ($c = 1,43$ in Chf).

b) $3\beta, 12\alpha$ -Diacetoxy-11-oxo- $\Delta^{14-5\beta}$, 17 ξ -ätiänsäure-methylester (**14**) aus **11**. 300 mg des Esters **11** wurden in 2,0 ml Py gelöst, auf –10° abgekühlt, mit 1,5 ml einer gekühlten Mischung von Py-SOCl_2 (1:1) versetzt und zunächst 3 Std. bei 0° und dann noch 30 Min. bei 20° stehengelassen. Nach dem Abkühlen zerlegte man das Gemisch mit kleinen Eisstückchen, versetzte mit 10 ml W und schüttelte 3mal mit je 20 ml Chf aus. Die Chf-Auszüge wurden der Reihe nach mit je 15 ml 2 N HCl, Sodalösung (2 ml 2 N Na_2CO_3 -Lösung in 15 ml W) und W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand gab im DC neben einem Hauptfleck noch 3 weitere, sehr schwache Flecke. Nach Chromatographie an 3 g SiO_2 konnten aus den Eindampfrückständen 233 mg reiner Ester **14** (Nadeln aus Chf-Ä-Pe), Smp. 170–173° und $[\alpha]_D^{24} = +120,8^\circ$ ($c = 1,227$ in Chf) erhalten werden. Nach dem Umlösen aus Chf-Ä-Pe Smp. 173–177°, $\text{C}(\text{NO}_2)_4$ -Probe in wenig Chf gelb.

c) 3β -12 α -Diacetoxy-11-oxo-5 β , 17 β H-ätiänsäure-methylester (**17**) aus **14**. 50 mg Ester **14** vom Smp. 170–173° wurden in 5 ml AcOH gelöst, mit 25 mg PtO_2 versetzt und 3 Std. bei 20° in der Schüttelbirne hydriert. Das nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt gab im DC nur einen Fleck, dessen Rf-Wert etwas kleiner war als der des Ausgangsmaterials **14**. (Spuren von Verunreinigungen waren im DC nur unter dem UV.-Licht feststellbar.) Aus Ä-Pe-Chf 27 mg reiner Ester **17** (Plättchen), Smp. 205–207°; $[\alpha]_D^{25} = +9,6^\circ$ ($c = 1,3$ in Chf); ORD.: siehe Fig. 7; $c = 0,101$; 25°. MG = 448 $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7$. PR.-Spektrum siehe Fig. 2. – In einem zweiten Hydrierungsversuch wurden aus 200 mg **14** 152 mg reiner kristallisierter Ester **17** erhalten.

VI. Partialsynthese von 3β , 11 β -Diacetoxy-12-oxo-5 β , 17 α H-ätiänsäure-methylester (18**) und 3β , 12 β -Diacetoxy-11-oxo-5 β , 17 α H-ätiänsäure-methylester (**19**).** – Diese beiden Isomere wurden aus 3β -Acetoxy-12-oxo-5 β , 17 α H-ätiänsäure-methylester (**20**) hergestellt, der

sich durch Abbau von Digoxigenin nach den Angaben von PATAKI *et al.* [8] leicht gewinnen lässt (Gesamtausbeute 12,3%). Die letzten Stufen wurden nach SCHINDLER [7] ausgeführt. Beispiel: 106 mg Keton **20** wurden in das amorphe 11-Bromketon übergeführt: 122 mg. Es war nach DC weitgehend einheitlich und enthielt (neben Spuren von nur im UV.-Licht sichtbaren Verunreinigungen) noch zu 5–10% ein polareres Nebenprodukt, aber kein **20**. Aus 121 mg 11-Bromketon wurden nach Reaktion mit KOH in Me (ohne vorherige Chromatographie) durch direkte Kristallisation (aus Ä-Pe) 49 mg reines **19** (Prismen) vom Smp. 225–235° und $[\alpha]_D^{25} = +36,7^\circ$ ($c = 1,34$ in Chf) erhalten. ORD.: siehe Fig. 7; $c = 0,106$; 25°. MG = 448, C₂₅H₃₆O₇. PR.-Spektrum siehe Fig. 3. – Die Herstellung des 11 β -Acetoxyesters **18** verursachte einige experimentelle Schwierigkeiten: 181 mg des 11-Bromketons gaben in einem Fall (nach wiederholter chromatographischer Auftrennung an SiO₂) 15 mg (= 8,4%) reinen Ester **18** (Prismen aus Ä-Pe) Smp. 167–171°, $[\alpha]_D^{25} = +138,5^\circ$ ($c = 0,64$ in Chf). ORD.: siehe Fig. 7; $c = 0,098$; 25°. PR.-Spektrum siehe Fig. 4. – In einem andern Ansatz mit 259 mg 11-Bromketon wurden nur 11 mg (5,8%) reine Kristalle gewonnen. Bei einem weiteren Ansatz mit 200 mg Bromid liess sich überhaupt kein **18** gewinnen.

Triketon 21 aus 5. 22 mg **5**, Smp. 206–214°, in 5 ml An gelöst, mit einem Überschuss an KILIANI-Lösung [15] 10 Min. bei 0° oxydiert. Übliche Aufarbeitung gab 16 mg Substanz. Aus CH₂Cl₂ Kristalle **21**, Smp. 210–217° (Sint. ab 206°). Die Mischprobe mit dem aus Arenobufagin bereiteten Triketon [4] zeigte keine Smp.-Depression und gab im DC [Chf-E-(9:1)] nur einen Fleck.

Triacetylverbindung 23 aus 16 über 22. 12 mg **16**, Smp. 156–159°, sowie 20 mg **16**, Smp. 158–160°, wurden in 20 ml THF mit einem Überschuss an LiAlH₄ reduziert. Übliche Aufarbeitung gab 29 mg rohes Tetrol, das in 1 ml Py mit 0,7 ml Ac₂O 15 Std. bei 37° acetyliert wurde. Aus CH₂Cl₂-Ä-Pn nach zweimaliger Kristallisation 14 mg zu Drusen vereinigte feine Nadeln vom Smp. 182–188° (Sint. ab 165°). PR.-Spektrum: (C-12)- α H: 4,74 ppm, Dublett $J \sim 9$ Hz. – 13 mg **22**, Smp. 182–188°, in 1 ml An mit 0,1 ml KILIANI-Lösung [15] 7 Min. bei 0° oxydiert, dann wie üblich aufgearbeitet: 13 mg Neutrales. Die daraus erhaltenen Kristalle gaben nach dem Umlösen aus wenig CH₂Cl₂-Pe 6 mg Prismen vom Smp. 151–153°. Nach DC (Ä-Pn-(1:1)) einheitlich und deutlich polarer als das aus **17** über **24** bereitete **25**, dagegen nach DC [Ä-Pn-(1:1); CH₂Cl₂-Al-(98,5:1,5); E-Pn-Bz-(1:1:1)], Misch-Smp. und PR.-Spektrum (siehe Fig. 5) identisch mit dem aus **19** bereiteten **23**.

Triacetylverbindung 25 aus 17 über 24. 20 mg **17**, Smp. 197–205°, in 8 ml THF mit 30 mg LiAlH₄ 5 Std. (unter Rückfluss) reduziert. Übliche Aufarbeitung [Chf-Al-(4:1)] gab 14 mg Substanz (nach DC [E-An-Pn-(1:1:1)] einheitlich), die 14 Std. bei 20° in Ac₂O-Py acetyliert wurden: 15 mg rohes **24**. PR.-Spektrum: (C-12 β)-H zeigt Dublett bei 4,65 ppm, $J \sim 3,5$ Hz. 6 mg rohes **24** wurden in 1 ml An mit 0,1 ml KILIANI-Lösung [15] 7 Min. bei 0° oxydiert. Übliche Aufarbeitung gab 5 mg Neutrales = **25**, das nach DC [Ä-Pn-(1:1)] deutlich unpolarer war als **23**.

26 aus 19. 18 mg **19**, Smp. 229–232°, und 5 mg gute ML **19** wurden in THF 6 Std. mit LiAlH₄ (unter Rückfluss) reduziert. Das rohe Tetrol (21 mg) wurde in Ac₂O-Py 17 Std. bei 20° acetyliert: 25 mg. Mit Ä durch etwas SiO₂ filtriert und aus Ä-Pn kristallisiert: 13,5 mg Nadeln **26**, Smp. 155–159°. PR.-Spektrum: (C-12 α)-H zeigt Dublett bei 4,67 ppm, $J \sim 3,5$ Hz.

28 aus 27. 70 mg **27** (PR.-Spektrum siehe Fig. 6), Smp. 168–170° in THF mit einem Überschuss an LiAlH₄ 6 Std. (unter Rückfluss) reduziert. Übliche Aufarbeitung gab 59 mg Schaum; aus An-Ä 38 mg Tetrol, Smp. 118–125° (Sint. ab 115°). Nach dem Umlösen 28 mg Prismen vom Smp. 119–125°, wovon 10 mg in Ac₂O-Py 14 Std. bei 20° acetyliert wurden: 12 mg rohes **28**. PR.-Spektrum: (C-12 β)-H zeigt Dublett bei 4,82 ppm, $J \sim 2,5$ Hz.

VII. Umlagerungsversuche. – a) 10 mg des Esters **16** wurden in 0,5 ml 20-proz. methanolischer KOH gelöst und 30 Min. gekocht. Nach dem Ansäuern mit 2N HCl (bis eben kongosauer) wurde mit 2–3 ml Chf ausgeschüttelt. Die Chf-Phasen wurden mit W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in wenig Me gelöst, mit ätherischem CH₂N₂ versetzt, 10 Min. bei 20° stehengelassen, im Vakuum zur Trockene gebracht und in einigen Tropfen Py und Ac₂O 16 Std. bei 37° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung konnten aus dem Rohprodukt durch Kristallisation (aus Ä-Pe) 5 mg reiner Ester **19** vom Smp. 231–236°, Misch-Smp. 229–234°, gewonnen werden.

b) 10 mg **17** wurden wie unter a) mit 20-proz. methanolischer KOH erhitzt usw. Es konnten 3 mg **17** in Kristallen vom Smp. 202–206° zurückgewonnen werden.

c) **27 aus 17.** 25 mg **17**, Smp. 205–207°, wurden in 1,25 ml DMF gelöst, mit einer warmen (50°) Lösung von 60 mg NaOAc in 0,04 ml W und 0,08 ml Ac₂O versetzt und in einer Ampulle einge-

schmolzen 12 Std. auf 110° erhitzt. Übliche Aufarbeitung gab 27 mg Schaum. Aus Ä-Pn 12 mg Kristalle **17**, Smp. 185–205° (Sint. ab 150°). Die ML gaben aus dem gleichen Lösungsmittel Rhomben, Smp. 150–160°, nach dem Umkristallisieren fächerartige Prismen, Smp. 158–163° (Sint. ab 155°). Misch-Smp. mit **27** ohne, mit **16** dagegen mit Depression.

d) **19** aus **27**. 32 mg **27** in 1,5 ml 20-proz. methanolischer KOH 30 Min. unter Rückfluss erhitzt, hierauf angesäuert und mit Hf-Ä -(1:4) ausgeschüttelt gab 30 mg Verseifungsprodukt. Dieses wurde mit ätherischer CH_2N_2 -Lösung verestert und anschliessend in $\text{Ac}_2\text{O-Py}$ 14 Std. bei 37° acetyliert. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das Rohprodukt in Ä durch wenig Al_2O_3 filtriert und eingedampft: aus Ä-Pn 13 mg **19**, Smp. 220–230° (Sint. ab 190°), nach Umkristallisieren 12 mg Nadeln, Smp. 230–232° (Sint. ab 210°); keine Smp.-Depression mit authentischem **19**. Aus der ML (Ä-Pn) Kristalle von **27**, Smp. 150–162°.

e) **19** aus **19**. 30 mg **19**, Smp. 235–237°, gelöst in 1,5 ml DMF, mit einer warmen Lösung (50°) von 75 mg NaOAc in 0,05 ml W und 0,1 ml Ac_2O versetzt, wurden in einer Ampulle eingeschmolzen 12 Std. auf 110° erhitzt. Nach üblicher Aufarbeitung 29 mg Substanz. Bei der Chromatographie an 3,0 g SiO_2 liessen sich mit [Bz-Ä-(4:1)] total 26 mg Substanz vom Smp. 220–230° eluieren. Umkristallisieren aus Ä-Pn gab 17 mg **19** vom Smp. 229–233°; keine Smp.-Depression mit Ausgangsmaterial **19**.

23 aus **26**. 9 mg ML von **26** wurden in 1,5 ml An mit 0,1 ml KILIANI-Lösung [15] 8 Min. bei 0° oxydiert. Übliche Aufarbeitung gab 9 mg Neutrales. Aus CH_2Cl_2 -Pe Prismen, Smp. 143–150°, die nach Misch-Smp., DC [Ä-Pn-(1:1); CH_2Cl_2 -Al-(98,5:1,5); E-Pn-Bz-(1:1:1)] und PR.-Spektrum identisch waren mit aus **16** bereitetem **23**.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der chinesischen Krötengiftdroge *Ch'an Su* konnte ein bisher unbekanntes Bufogenin isoliert werden, das sich bei den chromatographischen Auftrennverfahren wie Bufarenogin verhält, weshalb wir es ψ -Bufarenogin **5** nennen. – **5** und Arenobufogin (**3**) gehen bei der vorsichtigen Dehydrierung in dasselbe 3,11,12-Trioxobufadienolid über, unterscheiden sich somit lediglich in ihrer Ketolstruktur an C-11/C-12. Der aus der Acetylverbindung von **5** durch Abbau erhaltene Ätiansäuremethylester **17** war mit den vier möglichen, bereits bekannten C-11/C-12-Acetoxyketonen der Ätiansäure-Reihe nicht identisch. Auf Grund chemischer und vor allem spektroskopischer Befunde dürfte der aus **5** erhaltene Abbauester 17 β H-Konfiguration besitzen, die sich im Laufe des Abbaus durch Umlagerung ausgebildet hat. ψ -Bufarenogin ist 3 β ,12 α ,14-Trihydroxy-11-oxo-5 β -bufa-20,22-dienolid entsprechend Formel **5**. Bufarenogin besitzt 12 β -Hydroxy-11-oxo-Struktur; die Stereochemie an C-17 ist noch nicht abgeklärt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. ISELI, M. KOTAKE, Ek. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **48**, 1093 (1965).
- [2] R. REES, O. SCHINDLER, V. DEULOFEU & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 2400 (1959).
- [3] P. HOFER & K. MEYER, *Helv.* **43**, 1495 (1960).
- [4] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Tetrahedron Letters* 1959, No. 7, S. 8; *Helv.* **43**, 1950 (1960).
- [5] H. KÜNDIG-HEGEDÜS & O. SCHINDLER, *Helv.* **39**, 904 (1956).
- [6] O. RENKONEN, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Croatica chem. Acta* **29**, 239 (1957).
- [7] O. SCHINDLER, *Helv.* **39**, 1698 (1956).
- [8] S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **36**, 1295 (1953).
- [9] O. RENKONEN, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 182 (1959).
- [10] H. HEGEDÜS, Ch. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 98 (1955).
- [11] T. F. GALLAGHER & W. P. LONG, *J. biol. Chemistry* **162**, 521 (1946); W. P. LONG & T. F. GALLAGHER, *ibid.* **162**, 511 (1946); T. F. GALLAGHER *ibid.* **165**, 211 (1946); vergl. auch B. B. LONGWELL & O. WINTERSTEINER, *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 200 (1940).

- [12] CH. TAMM & G. BAUMGARTNER, *Helv.* **38**, 441 (1955).
 - [13] M. STEIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **21**, 828 (1938); K. MEYER, *Helv.* **32**, 1238 (1949).
 - [14] H. TOBIAS, *Helv.* **46**, 159 (1963).
 - [15] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1946**, 39; R. G. CURTIS, SIR IAN HEILBRON, E. R. H. JONES & G. P. WOODS, *J. chem. Soc.* **1953**, 457.
 - [16] N. S. BHACCA & D. H. WILLIAMS, «Applications of NMR.-Spectroscopy in Organic Chemistry», Holden-Day Inc., San Francisco, Calif., 1964, S. 117.
 - [17] R. F. ZÜRCHER, *Helv.* **46**, 2054 (1963).
 - [18] s. [16], S. 14 ff.
 - [19] H. SUHR, «Anwendungen der Kernmagnetischen Resonanz in der Organischen Chemie», Springer Verlag, Berlin 1965, S. 244 ff.
 - [20] K. MEYER, *Helv.* **30**, 1976 (1947), und weitere Lit. daselbst.
 - [21] P. ST. JANIÁK, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, *Helv.* **50**, 1249 (1967), siehe besonders S. 1253 und daselbst Fussnote 13.
 - [22] J.-P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1270 (1957), siehe besonders S. 1285, Fussnote 26.
-

Curriculum vitae

Am 5. Juni 1932 wurde ich, KURT HUBER, als Sohn des Gustav Adolf Huber, Chauffeur, Bürger von Nusshof (BL) und seiner Ehefrau Frida, geb. Böhringer, in Basel geboren.

Nach dem Besuch der Primar- und Sekundarschule an meinem Wohnort Binningen trat ich im Sommer 1947 als Laborgehilfe in die CIBA AG ein, wo ich nach einer mit Erfolg abgeschlossenen Laborantenlehre bis zum Sommer 1953 tätig war. Darauf arbeitete ich unter Herrn Prof. Dr. F. Verzàr im Physiologischen Institut und ab 1956 im Gerontologischen Laboratorium. Neben meiner Berufsarbeit bereitete ich mich auf die eidgenössische Maturität vor, welche ich im April 1958 in Bern bestand. Anschliessend immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und nach Aufgabe meiner Berufstätigkeit begann ich im Herbst 1958 mit dem Chemie-Studium. Vom April 1959 bis zum September 1963 arbeitete ich zudem als Hilfslehrer für Laboranten an den Allg. Gewerbeschule in Basel.

Im Oktober 1960 bestand ich das Hauptexamen in anorganischer und analytischer Chemie, im Mai 1961 das Nebenfachexamen in Zoologie, im Februar 1962 dasjenige in Physik und im Dezember 1962 dasselbe in physikalischer Chemie. Im September 1963 bestand ich das Vorexamen in Farbenchemie und schliesslich im Oktober 1963 das Vorexamen in organischer Chemie. Im selben Monat begann ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Kuno Meyer am Pharmazeutischen Institut der Universität Basel mit der vorliegenden Dissertation.

Im Verlaufe meines Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren: H. Annaheim, M. Brenner, P. Buchner, A. Bühler, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, M. Geiger-Huber, C. Grob, P. Huber, W. Kuhn, H. Labhart, K. Meyer, E. Miescher, H. Nüesch, A. Portmann, B. Prijs, T. Reichstein, Ch. Tamm, R. Wizinger. – Allen diesen Dozenten danke ich für die gute Ausbildung, welche ich bei ihnen erhalten habe.

